

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 29 December 1999 (29.12.99)	
International application No.: PCT/JP99/03360	Applicant's or agent's file reference: 661366
International filing date: 24 June 1999 (24.06.99)	Priority date: 25 June 1998 (25.06.98)
Applicant: ITOH, Kyogo et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

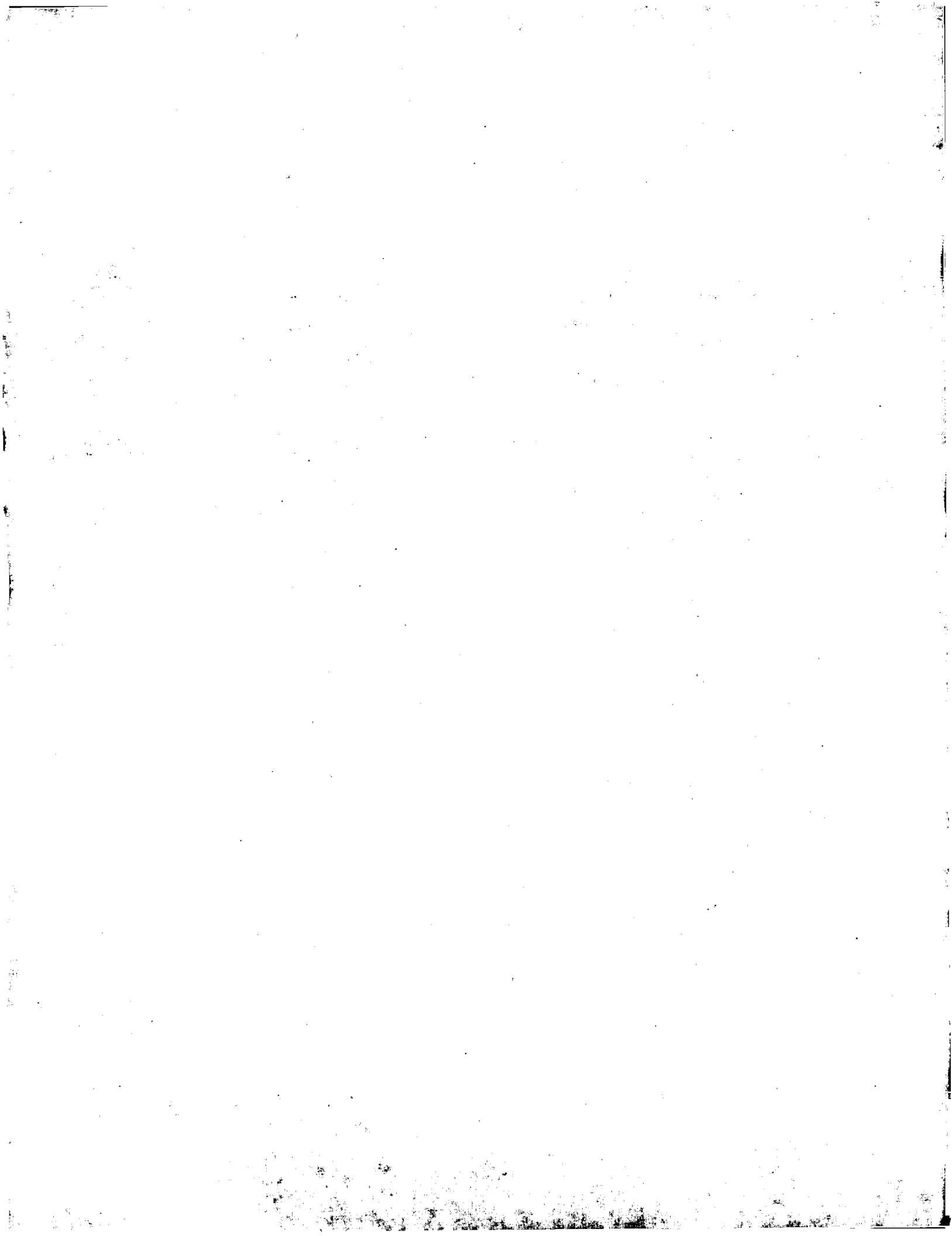
☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:
12 November 1999 (12.11.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	



12T
09/720 469
5630
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 661366	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/03360	International filing date (day/month/year) 24 June 1999 (24.06.99)	Priority date (day/month/year) 25 June 1998 (25.06.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 14/47, 7/06, 16/18, C12N 5/00, A61K 35/12, 38/08, 39/00, 48/00, G01N 33/53, 33/574		
Applicant SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY, LIMITED		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 12 November 1999 (12.11.99)	Date of completion of this report 07 July 2000 (07.07.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/03360

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

☒ the international application as originally filed

☐ the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

☐ the claims:

pages _____, as originally filed

pages _____, as amended (together with any statement under Article 19

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

☐ the drawings:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

☐ the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).

☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).

☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

☒ contained in the international application in written form.

☐ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages _____

☐ the claims, Nos. _____

☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/03360

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-25	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-25	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-25	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The subject matters of claims 1-25 are neither described in any of the documents cited in the ISR and the documents considered to relate to the present invention, nor obvious to a person skilled in the art.

1

2

3

4

特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 21 JUL 2000

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 661366	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/03360	国際出願日 (日.月.年) 24.06.99	優先日 (日.月.年) 25.06.98
国際特許分類(IPC) Int.Cl ⁷ C07K 14/47, C07K 7/06, C07K 16/18, C12N 5/00, A61K 35/12, A61K 38/08, A61K 39/00, A61K 48/00, G01N 33/53, G01N 33/574		
出願人(氏名又は名称) 伊東 恭悟		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
 - ☒ 国際予備審査報告の基礎
 - ☐ 優先権
 - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
 - ☐ 発明の単一性の欠如
 - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - ☐ ある種の引用文献
 - ☐ 国際出願の不備
 - ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 12.11.99	国際予備審査報告を作成した日 07.07.00	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 高堀 栄二	4 B 9281
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

様式PCT/IPEA/409(表紙)(1998年7月)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☒ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-25	有
	請求の範囲		無
進歩性(I S)	請求の範囲	1-25	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性(I A)	請求の範囲	1-25	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1-25に記載されている発明は、いずれも国際調査報告に表示された文献及び当該発明に関連があると認められる文献に記載されておらず、当業者にとって自明なものでもない。

EP



PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 661366	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/03360	国際出願日 (日.月.年) 24.06.99	優先日 (日.月.年) 25.06.98
出願人(氏名又は名称) 伊東 恭悟		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

- a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
- b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
 第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。 ☒ なし
☐ 出願人は図を示さなかった。
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl[°] C07K14/47, 7/06, 7/08, 16/18, C12N5/00, A61K35/12, 38/08, 39/00, 48/00, G01N33/53, 33/574

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl[°] C07K14/47, 7/06, 7/08, 16/18, C12N5/00, A61K35/12, 38/08, 39/00, 48/00, G01N33/53, 33/574

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), REGISTRY (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	E. ROYDON PRICE et al., "Human cyclophilin B: A second cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl isomerase with a signal sequence", Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 88 (5), p. 1903-1907 (1991), 特に FIG. 1 参照	1-25
Y	Hans-Georg Rammensee et al., "MHC ligands and peptides motifs: first listing", Immunogenetics, Vol. 41, p. 178-228 (1995), 特に p. 193, 195 参照	1-12
Y	JP, 8-500106, A (サイテル コーポレーション), 9. 1月. 1996 (09. 01. 96), 文献全体参照, & WO, 94/3205, A1 & EP, 656788, A1	1-12
Y	JP, 9-151200, A (味の素株式会社), 10. 6月. 1997 (10. 06. 97), 文献全体参照, & EP, 770624, A2 & KR, 97015602, A & US, 5837248, A	1-25

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 09. 99

国際調査報告の発送日

28.09.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

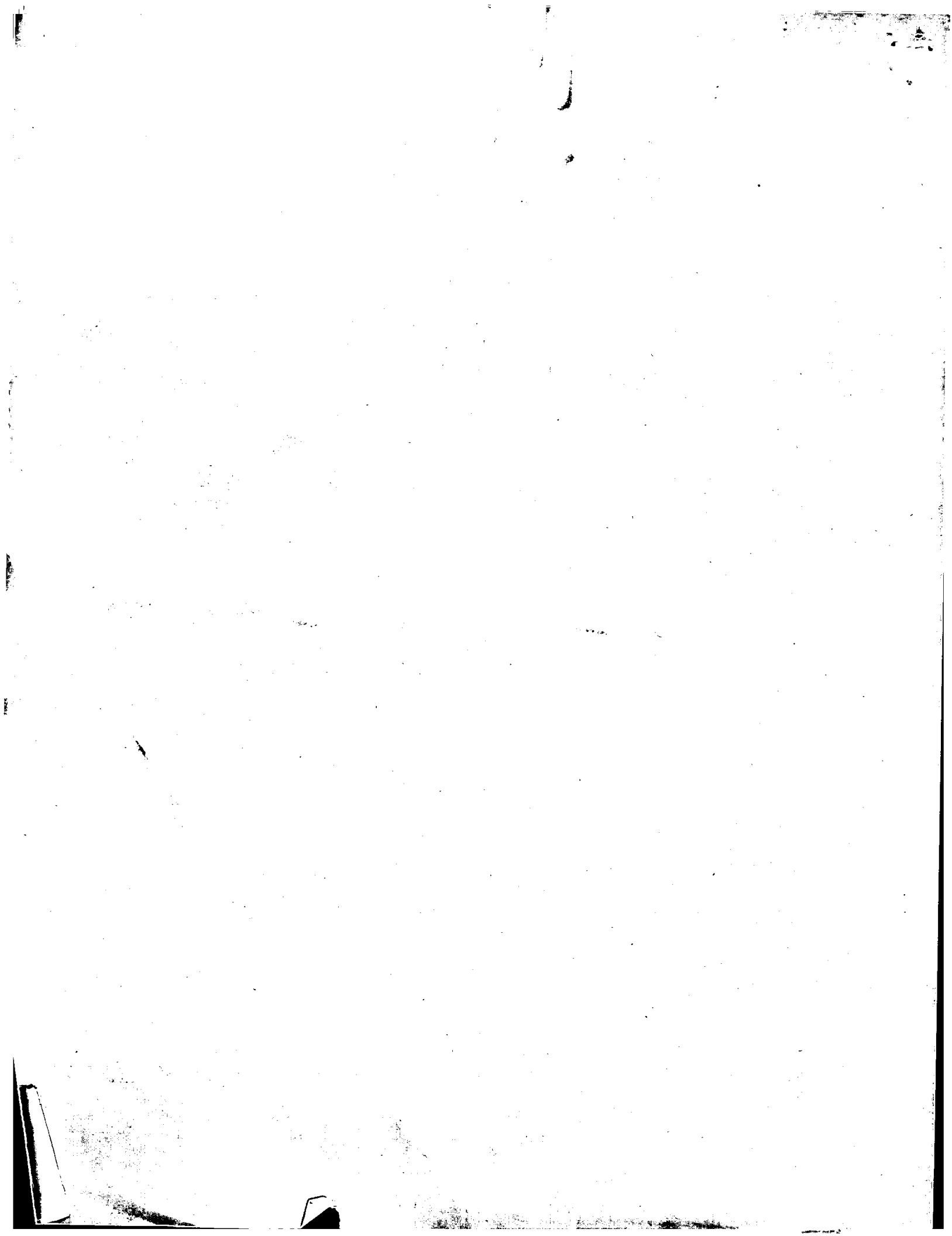
特許庁審査官 (権限のある職員)

坂崎 恵美子 印

4 N

945.1

電話番号 03-3581-1101 内線 3488





P.B.5818 - Patentlaan 2
2280 HV Rijswijk (ZH)
☎ +31 70 340 2040
TX 31651 epo nl
FAX +31 70 340 3016

**Europäisches
Patentamt**

Zweigstelle
in Den Haag
Recherchen-
abteilung

**European
Patent Office**

Branch at
The Hague
Search
division

**Office européen
des brevets**

Département à
La Haye
Division de la
recherche

VOSSIUS & PARTNER
Siebertstrasse 4
81675 München
ALLEMAGNE

EINGEGANGEN
Vossius & Partner

27. Mai 2002

Frist
bearb.:

Datum/Date

24.05.02

Zeichen/Ref./Réf. E 3105 EP	Anmeldung Nr./Application No./Demande n°/Patent Nr./Patent No./Brevet n°. 99926783.4-2406-JP9903360
Anmelder/Applicant/Demandeur/Patentinhaber/Propriétaire/Titulaire Sumitomo Pharmaceuticals Company, Limited, et al	

COMMUNICATION

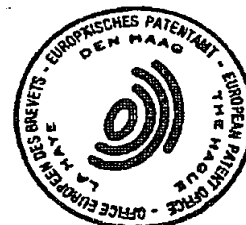
The European Patent Office herewith transmits as an enclosure the European search report for the above-mentioned European patent application.

If applicable, copies of the documents cited in the European search report are attached.

☒ Additional set(s) of copies of the documents cited in the European search report is (are) enclosed as well.

REFUND OF THE SEARCH FEE

If applicable under Article 10 Rules relating to fees, a separate communication from the Receiving Section on the refund of the search fee will be sent later.







European Patent
Office

**SUPPLEMENTARY
EUROPEAN SEARCH REPORT**

Application Number
EP 99 92 6783

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.6)
X	CHAO LOTUNG ET AL: "Up regulation of gene expression and increased production of cyclophilin A in murine granulomas of skin and liver." JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, vol. 102, no. 4, 1994, page 589 XP001033799 Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology; Baltimore, Maryland, USA; April 27-30, 1994 ISSN: 0022-202X * the whole document *	1,3,7, 12,13,25	C07K14/47 C07K7/06 C07K7/08 C07K16/18 C12N5/00 A61K35/12 A61K38/08 A61K39/00 A61K48/00 G01N33/53
X	ALKHATIB G ET AL: "Cellular distribution of a natural killer cell tumour recognition-related surface antigen in purified human lymphocytes." IMMUNOLOGY, vol. 92, no. 2, 1997, pages 173-179, XP001033900 ISSN: 0019-2805 * the whole document *	15	
A	* the whole document *	1-26	TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.6)
A	EP 0 326 067 A (DU PONT) 2 August 1989 (1989-08-02) * the whole document *	26	C12N C07K
T	GOMI S ET AL: "A CYCLOPHILIN B GENE ENCODES ANTIGENIC EPITOPES RECOGNIZED BY HLA-A24-RESTRICTED AND TUMOR-SPECIFIC CTLS" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, vol. 163, 1999, pages 4994-5004, XP002948569 ISSN: 0022-1767 * the whole document *	1-26	
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.			
Place of search MUNICH		Date of completion of the search 15 May 2002	Examiner Wimmer, G
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS			
X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document		T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document	

3

EPO FORM 1503 03.82 (P04C04)

**ANNEX TO THE EUROPEAN SEARCH REPORT
ON EUROPEAN PATENT APPLICATION NO.**

EP 99 92 6783

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned European search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

15-05-2002

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0326067 A	02-08-1989	AU 2887889 A	27-07-1989
		DK 31889 A	27-07-1989
		EP 0326067 A2	02-08-1989
		JP 1233225 A	19-09-1989
		PT 89531 A	04-10-1989
		ZA 8900629 A	26-09-1990
<hr/>			

09/720469

JC01 Rec'd PCT/PTO 22 DEC 2000

(translation)

INTERNATIONAL FORM

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURERECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSITissued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page.NAME AND ADDRESS
OF DEPOSITOR

NAME: Kyogo Itoh

ADDRESS: 2-25-9, Keyaki-dai, Kiyama-cho,
Miyaki-gun, Saga-ken, Japan

1. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISMS	
Identification reference given by the DEPOSITOR KG-CTL	(Deposit No.) FERM BP-6725
2. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input checked="" type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation	
3. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism as identified under 1 above, which was received by it on June 19, 1998 (dated of the original deposit).	
4. RECEIPT OF REQUEST FOR TRANSFER	
This International Depositary Authority received the microorganism as recited in the above item 1 on June 19, 1998, (dated of the original deposit) and then received a request for transfer the original deposit to International deposition under Budapest Treaty on May 20, 1999 (transferred from No. P-16854 deposited on June 19, 1998).	
5. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology Dr. Shinichi Ohashi, Director-General. Address: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305, JAPAN May 20, 1999	



100-100000

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される。

原寄託についての受託証

氏名 (名称)

伊東 恭悟

殿

寄託者

あて名 〒

佐賀県三養基郡基山町けやき台 2-25-9

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) KG-CTL	(受託番号) FERM BP- 6725
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 ■ 科学的性質 ■ 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 10 年 6 月 19 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、平成 10 年 6 月 19 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。 そして、平成 11 年 5 月 20 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。 (平成 10 年 6 月 19 日に寄託された微工研菌寄第 P- 16854 号より移管)	
5. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 National Institute of Advanced Industrial Science and Technology 名称: Agency of Industrial Science and Technology 所長 大箸 信一 Dr. Shinichi Oshichi Director-General あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305-8566) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN 平成 11 年 (1999) 5 月 20 日	



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類 C07K 14/47, 7/06, 7/08, 16/18, C12N 5/00, A61K 35/12, 38/08, 39/00, 48/00, G01N 33/53, 33/574	A1	(11) 国際公開番号 WO99/67288 (43) 国際公開日 1999年12月29日(29.12.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/03360 (22) 国際出願日 1999年6月24日(24.06.99) (30) 優先権データ 特願平10/178449 1998年6月25日(25.06.98) (71) 出願人 ; および (72) 発明者 伊東恭悟(ITO, Kyogo)[JP/JP] 〒841-0205 佐賀県三養基郡基山町けやき台2-25-9 Saga, (JP) (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 住友製薬株式会社(SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY, LIMITED)[JP/JP] 〒541-8510 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号 Osaka, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 五味慎也(GOMI, Shinya)[JP/JP] 〒719-1106 岡山県総社市泉3-61 Okayama, (JP)	(74) 代理人 青山 稔, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP) (81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書 明細書とは別に規則13の2に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示	
(54)Title: TUMOR ANTIGEN PEPTIDES ORIGINATING IN CYCLOPHILIN B (54)発明の名称 サイクロフィリンB由来の腫瘍抗原ペプチド (57) Abstract Tumor antigen peptides originating in cyclophilin B or derivatives thereof having functionally equivalent characteristics thereto; remedies, preventives or diagnostics for tumors containing as the active ingredient these tumor antigen peptides, derivatives thereof, cyclophilin or peptide fragments thereof, or genes encoding the cyclophilin or peptides fragments thereof; use of the above substances in treating tumors <i>in vitro</i> ; and antibodies against the above tumor antigen peptides or derivatives thereof.		

(57)要約

サイクロフィリン由来の腫瘍抗原ペプチド又は機能的に同等の特性を有するその誘導体、これら腫瘍抗原ペプチド又はその誘導体、サイクロフィリンおよびその部分ポリペプチド、あるいは該サイクロフィリン若しくはその部分ポリペプチドをコードする遺伝子を有効成分とする腫瘍の治療剤、予防剤、または診断薬、腫瘍の治療の為の前記の物質のin vitroでの使用、および前記サイクロフィリン由来の腫瘍抗原ペプチド又はその誘導体に対する抗体を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IN	インド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IS	アイスランド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	JP	日本	NZ	ニュー・ジーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェッコ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
		KR	韓国				

明 細 書

サイクロフィリンB由来の腫瘍抗原ペプチド

技術分野

5 本発明は、サイクロフィリン由来の新規な腫瘍抗原ペプチド等に関する。より具体的には、サイクロフィリンB由来の腫瘍抗原ペプチドおよび機能的に同等の特性を有するその誘導体、さらにはこれらの腫瘍抗原ペプチドおよびその誘導体やサイクロフィリンBポリペプチドまたはその遺伝子を、in vivoまたはin vitroで利用した腫瘍の治療剤、予防剤、または診断薬などに関する。

背景技術

10 生体による腫瘍の排除には、免疫系、特にT細胞が重要な役割を果たしていることが知られている。実際、ヒトの腫瘍局所には腫瘍細胞に対して傷害活性を示すリンパ球の浸潤が認められ (Arch. Surg., 126:200, 1990)、メラノーマからは自己の腫瘍細胞を認識する細胞傷害性T細胞 (CTL) が比較的容易に分離されている (Immunol. Today, 8:385, 1987、J. Immunol., 138:989, 1987、
15 Int. J. Cancer, 52:52, 1992等)。また、該CTLの移入によるメラノーマ治療の臨床結果からも、腫瘍排除におけるT細胞の重要性が示唆されている (J. Natl. Cancer. Inst., 86:1159, 1994)。

自己の腫瘍細胞を攻撃するCTLが標的とする分子については長い間不明であったが、最近の免疫学および分子生物学の進歩により次第に明らかになってきた。
20 すなわちCTLは、T細胞受容体 (TCR) を用いて、腫瘍抗原ペプチドと呼ばれるペプチドと主要組織適合遺伝子複合体クラスI抗原 (MHCクラスI抗原、ヒトの場合はHLA抗原と呼ばれる) との複合体を認識することにより、自己の腫瘍細胞を攻撃していることが明らかとなった。

腫瘍抗原ペプチドは、腫瘍に特有のタンパク質、すなわち腫瘍抗原タンパク質
25 が細胞内で合成された後、プロテアソームにより細胞内で分解されることによって生成される。生成された腫瘍抗原ペプチドは、小胞体内でMHCクラスI抗原 (HLA抗原) と結合して複合体を形成し、細胞表面に運ばれて抗原提示される。この抗原提示された複合体を腫瘍特異的なCTLが認識し、細胞傷害作用やリンフォカインの産生を介して抗腫瘍効果を示す。このような一連の作用の解明に伴い、

腫瘍抗原タンパク質あるいは腫瘍抗原ペプチドをいわゆる癌ワクチンとして利用することにより、腫瘍患者の体内の腫瘍特異的CTLを増強させる治療法が可能となった。

5 腫瘍抗原タンパク質としては、1991年にT. Boonらが初めてMAGEと名付けたタンパク質をヒトメラノーマ細胞から同定した (Science, 254:1643, 1991)。その後、いくつかの腫瘍抗原タンパク質が、主にメラノーマ細胞から同定されている。メラノーマ抗原としては、メラノサイト組織特異的タンパク質である gp100

(J. Exp. Med., 179:1005, 1994)、MART-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:3515, 1994)、tyrosinase (J. Exp. Med., 178:489, 1993) などのメラノソームタンパク質、メラノーマだけでなく各種癌細胞と正常精巣細胞に発現するMAGE関連タンパク質群 (J. Exp. Med., 179:921, 1994)、腫瘍特異的なアミノ酸変異を持つ β -catenin (J. Exp. Med., 183:1185, 1996)、CDK 4 (Science, 269:1281, 1995) などが同定されている。また、メラノーマ以外の腫瘍抗原タンパク質としては、HER2-neu (J. Exp. Med., 181:2109, 1995)、p53

10 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:14704, 1996) などの癌遺伝子産物、CEA (J. Natl. Cancer. Inst., 87:982, 1995)、PSA (J. Natl. Cancer. Inst., 89:293, 1997) などの腫瘍マーカー、HPV (J. Immunol., 154:5934, 1995)、EBV (Int. Immunol., 7:653, 1995) などのウイルスタンパク質などが同定されている。これらについては、総説 (Immunol. Today, 18:267, 1997、J. Exp. Med., 183:725, 1996、Curr. Opin. Immunol., 8:628, 1996等) の記述に詳しい。

15 20

腫瘍抗原タンパク質や腫瘍抗原ペプチドを腫瘍の治療や診断に応用するためには、メラノーマに比べて発生頻度が圧倒的に高い胃癌、肺癌などの上皮性腫瘍に広く適応可能な腫瘍抗原の同定が重要である。これに関して、本発明者らは食道癌由来の扁平上皮癌細胞から新規な腫瘍抗原タンパク質をコードする遺伝子のクローニングを行い、HLAの型がHLA-A24またはHLA-A26であるHLA抗原に結合して提示されるいくつかの腫瘍抗原ペプチドを、メラノーマ以外の腫瘍細胞から初めて同定した (J. Exp. Med., 187:277, 1998、国際公開公報 W097/46676)。

25

これらの腫瘍抗原ペプチドを実際に臨床に適用する際には、1種のみならず、複数の異なる腫瘍抗原ペプチドを使用することが望ましい。すなわち、全ての癌

細胞が共通に同一の腫瘍抗原を発現しているとは限らず、また、一つの癌細胞上に2種以上の異なる腫瘍抗原ペプチドが提示されていることを考慮すると、複数の異なる腫瘍抗原ペプチドを用いた治療がより効果的であると考えられる。事実、メラノーマにおいては、単一の腫瘍抗原由来のペプチドのみでは効果が不十分であったことから、複数のペプチドのカクテル製剤の開発が試みられている

(Int. J. Cancer, 66:162, 1996、Int. J. Cancer, 67:54, 1996)。このような背景から、発生頻度の高い胃癌、肺癌などの上皮性腫瘍において幅広く適用可能な、新たな腫瘍抗原タンパク質および腫瘍抗原ペプチドの同定が望まれている状況にある。

10 発明の開示

本発明は、サイクロフィリン由来の新規な腫瘍抗原ペプチド等を提供することを目的とする。より具体的には、サイクロフィリンB由来の腫瘍抗原ペプチドおよび機能的に同等の特性を有するその誘導体、さらにはこれらの腫瘍抗原ペプチドおよびその誘導体やサイクロフィリンBポリペプチドまたはその遺伝子を、in vivoまたはin vitroで利用した腫瘍の治療剤、予防剤または診断薬などを提供することを目的とする。

本発明のサイクロフィリンB由来腫瘍抗原ペプチドは、日本人や白人が高い確率で保有しているHLA抗原、すなわちHLA-A24およびHLA-A2に結合して提示される腫瘍抗原ペプチドを含むものであり、さらに肺癌、膀胱癌、骨肉腫等の上皮性腫瘍あるいは白血病といった幅広い腫瘍の治療あるいは予防に応用可能な腫瘍抗原ペプチドである。従って本発明の腫瘍抗原タンパクであるサイクロフィリンBおよびその遺伝子、あるいは当該サイクロフィリンB由来の腫瘍抗原ペプチドは、新規な抗腫瘍剤としての有用性が予想される。

本発明者らは、新たな腫瘍抗原ペプチドおよびその由来となる腫瘍抗原タンパク質を得るために、以下の試みを行った。

まず本発明者らは、肺腺癌患者のリンパ球より、HLA-A24あるいはHLA-A2陽性の膀胱癌、肺癌、骨肉腫あるいは白血病細胞株等を認識するCTL株を樹立し、これをKG-CTL（受託番号:FERM BP-6725）と命名した。

つづいて、前記KG-CTLが強く反応する膀胱癌細胞株HT-1376からcDNAライブラ

リーを作製し、該ライブラリーの組換えプラスミドとHLA-A2402 (HLA-A24の一種)cDNAの組換えプラスミドをCOS-7細胞にダブルトランスフェクトし、そのトランスフェクタントに先のKG-CTLを作用させ、KG-CTLが活性化されるか否かをIFN- γ の産生量で測定するというスクリーニングを繰り返すことにより、最終的に、1つの腫瘍抗原タンパク質の遺伝子のクローニングに成功した。塩基配列決定の結果、該腫瘍抗原タンパク質は、サイクロフィリンBという既知のタンパク質と同一のアミノ酸配列を有することが明らかとなった。

サイクロフィリンBは、免疫抑制剤であるサイクロスポリンAの結合タンパク質であり、免疫細胞の活性化に関与することが知られている。しかし腫瘍抗原としての機能は、本発明以前には全く知られていなかった。

本発明者らは次に、該サイクロフィリンBのアミノ酸配列において、HLA-A24およびHLA-A2に結合して提示される腫瘍抗原ペプチド部分を同定し、これらのペプチドおよび該ペプチドの誘導体に、腫瘍抗原ペプチドとしての活性の存することを明らかにした。

さらに本発明者らは、サイクロフィリンBのホモログであるサイクロフィリンA、サイクロフィリンCおよびサイクロフィリンDも、サイクロフィリンBと同様に腫瘍抗原タンパク質としての活性を有していることを明らかにした。

本発明は、以上のような知見に基づき完成するに至ったものである。

すなわち本発明は、

(1) サイクロフィリン由来の部分ペプチドであって、かつHLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体、

(2) サイクロフィリンB由来の部分ペプチドであって、かつHLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体、

(3) HLA抗原がHLA-A24またはHLA-A2である前記(1)または(2)記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体、

(4) 配列番号：1～配列番号：36、または配列番号：41～配列番号：4

3のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、前記(3)記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体、

5 (5) 配列番号：1または配列番号：2に記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、前記(4)記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体、

10 (6) 配列番号：1～配列番号：36のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位および／またはC末端のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、前記(4)記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体、

(7) 配列番号：1または配列番号：2に記載のアミノ酸配列の第2位および／またはC末端のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、前記(6)記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体、

15 (8) 配列番号：1～配列番号：11のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンまたはトリプトファンに置換され、および／またはC末端のアミノ酸残基がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンに置換されたアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、前記(6)記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体、

20 (9) 配列番号：12～配列番号：36のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位がロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンに置換され、および／またはC末端のアミノ酸残基がバリンまたはロイシンに置換されたアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、前記(6)記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体、

25 (10) 配列番号：37または配列番号：38に記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、前記(8)記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体、

(11) 配列番号：39または配列番号：40に記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、前記(10)記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体、

(12) 前記(1)～(11)いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドおよびその誘導体から選択される少なくとも1種を有効成分として含有してなる、腫瘍の治療剤または予防剤、

5 (13) サイクロフィリン、またはHLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチド部分を含むサイクロフィリンの部分ポリペプチド、あるいはこれらサイクロフィリンまたはその部分ポリペプチドをコードする遺伝子を有効成分として含有してなる、腫瘍の治療剤または予防剤、

10 (14) サイクロフィリンB、またはHLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチド部分を含むサイクロフィリンBの部分ポリペプチド、あるいはこれらサイクロフィリンBまたはその部分ポリペプチドをコードする遺伝子を有効成分として含有してなる、腫瘍の治療剤または予防剤、

(15) 前記(1)～(11)いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体に特異的に結合する抗体、

15 (16) 腫瘍患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞の表面に、HLA抗原と前記(1)～(11)いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を提示させてなる抗原提示細胞、

20 (17) サイクロフィリン、またはHLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチド部分を含むサイクロフィリンの部分ポリペプチド、あるいはこれらサイクロフィリンまたはその部分ポリペプチドをコードする遺伝子を、腫瘍患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞に取り込ませて作製される、HLA抗原と当該サイクロフィリン由来の腫瘍抗原ペプチドとの複合体の提示された抗原提示細胞、

25 (18) サイクロフィリンB、またはHLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチド部分を含むサイクロフィリンBの部分ポリペプチド、あるいはこれらサイクロフィリンBまたはその部分ポリペプチドをコードする遺伝子を、腫瘍患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞に取り込ませて作製される、HLA抗原と当該サイクロフィリンB由来の腫瘍抗原ペプチドとの複合体の提示された抗原提示細胞、

(19) 前記(16)～(18)いずれか記載の抗原提示細胞を有効成分とし

て含有してなる腫瘍の治療剤、

(20) HLA抗原と前記(1)～(11)いずれか記載の腫瘍抗原ペプチド
またはその誘導体との複合体を特異的に認識する細胞傷害性T細胞、

5 (21) 前記(16)～(18)いずれか記載の抗原提示細胞に提示されたH
LA抗原と腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を特異的に認識する細
胞傷害性T細胞、

(22) 前記(20)または(21)記載の細胞傷害性T細胞を有効成分とし
て含有してなる腫瘍の治療剤、

10 (23) 受託番号がFERM BP-6725である、細胞傷害性T細胞KG
-CTL、

(24) 前記(23)記載のKG-CTLを用いることを特徴とする、腫瘍抗
原タンパク質または腫瘍抗原ペプチドの同定方法、ならびに

(25) 前記(1)～(11)いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導
体を有効成分として含有する腫瘍の診断薬、に関する。

15 本発明は、サイクロフィリンという物質が腫瘍抗原タンパク質としての活性を
有することを初めて明らかにしたことに基づくものである。以下、本発明の実施
態様としてサイクロフィリンBに関して具体的に説明するが、以下の説明は、他
の公知のサイクロフィリン、すなわちサイクロフィリンA、サイクロフィリンC
およびサイクロフィリンD (Biochemistry, 3, p8218, 1994) にも当てはまるもの
20 であり、サイクロフィリンBにのみ限定されるものではない。

本発明において腫瘍抗原ペプチドとは、サイクロフィリンBの一部よりなる部
分ペプチドであって、かつHLA抗原と結合してCTLにより認識され得る腫瘍
抗原ペプチドである。すなわち、WWW Entrezデータベース検索においてGenbank
Accession No. M60857として登録されており、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,
25 88:p1903-1907, 1991に記載されているヒトサイクロフィリンBのアミノ酸配列の
一部よりなるペプチドであって、かつ、該ペプチドとHLA抗原との結合複合体
がCTLにより認識され得るようなペプチドであれば、当該サイクロフィリンB
のアミノ酸配列中の如何なる位置に存する如何なる長さのペプチドであっても、
全て、本発明の腫瘍抗原ペプチドの範疇に含まれる。このような本発明の腫瘍抗

原ペプチドは、サイクロフィリンBの一部よりなる候補ペプチドを合成し、該候補ペプチドとHLA抗原との複合体がCTLにより認識されるか否か、すなわち候補ペプチドが腫瘍抗原ペプチドとしての活性を有するか否かをアッセイすることにより、同定することができる。

- 5 ここで、ペプチドの合成については、通常のペプチド化学において用いられる方法に準じて行うことができる。該公知方法としては文献（ペプタイド・シンセシス (Peptide Synthesis) , Interscience, New York, 1966 ; ザ・プロテインズ (The Proteins) , Vol 2, Academic Press Inc., New York, 1976 ; ペプチド合成, 丸善 (株) , 1975 ; ペプチド合成の基礎と実験、丸善 (株) , 1985 ; 医薬品の開発 続 第14巻・ペプチド合成, 広川書店, 1991) などに記載されている方法が挙げられる。

次に、本発明の腫瘍抗原ペプチドの同定方法につき、以下に記述する。

- HLA-A1, -A0201, -A0204, -A0205, -A0206, -A0207, -A11, -A24, -A31, -A6801, -B7, -B8, -B2705, -B37, -Cw0401, -Cw0602などのHLAの型については、該HLAに結合して提示される抗原ペプチドの配列の規則性（モチーフ）が判明している（例えばImmunogenetics, 41:p178, 1995などを参照のこと）。例えばHLA-A24のモチーフとしては、8～11アミノ酸よりなるペプチドのうちの第2位のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンまたはトリプトファンであり、C末端のアミノ酸がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン又はメチオニンとなることが知られている

(J. Immunol., 152, p3913, 1994, Immunogenetics, 41:p178, 1995, J. Immunol., 155:p4307, 1994) 。またHLA-A2のモチーフについては、以下の表1に示したモチーフが知られている (Immunogenetics, 41, p178, 1995, J. Immunol., 155:p4749, 1995) 。

表 1

HLA-A2のタイプ	N末端から2番目のアミノ酸	C末端のアミノ酸
HLA-A0201	L, M	V, L
HLA-A0204	L	L
HLA-A0205	V, L, I, M	L
HLA-A0206	V, Q	V, L
HLA-A0207	L	L

(ペプチドの長さは8～11アミノ酸)

10 ペプチドの長さとしては、各種HLA分子に結合している抗原ペプチドの解析により (Immunogenetics, 41:178, 1995)、通常8から14アミノ酸程度であることが明らかにされている (ただしHLA - DR、 - DP、 - DQについては、14アミノ酸以上の長さの抗原ペプチドも認められる)。

15 これらのモチーフに関わるペプチド部分を前記サイクロフィリンBのアミノ酸配列中から選び出すのは容易である。すなわち、当該サイクロフィリンBのアミノ酸配列を見れば、上記モチーフ構造に関わるペプチド部分を容易に選び出すことができる。選び出された候補ペプチドを前述の方法にて合成し、該候補ペプチドとHLA抗原との結合複合体がCTLにより認識されるか否か、すなわち候補ペプチドが腫瘍抗原ペプチドとしての活性を有するか否かを測定することにより、本発明の腫瘍抗原ペプチドを同定することができる。

20 本発明の腫瘍抗原ペプチドの具体的な同定法としては、例えば J. Immunol., 154, p2257, 1995に記載の方法が挙げられる。すなわち、候補ペプチドを提示すると考えられるタイプのHLA抗原が陽性のヒトから末梢血リンパ球を単離し、in vitroで該候補ペプチドを添加して刺激した場合に、該候補ペプチドをパルスしたHLA抗原提示細胞を特異的に認識するCTLが誘導された場合は、該候補ペプチドが腫瘍抗原ペプチドに成り得ることが示される。ここでCTLの誘導の有無は、例えば、抗原ペプチド提示細胞に反応してCTLが産生する種々のサイトカイン (例えばIFN- γ) の量を、例えばELISA法などによって測定することにより、調べることができる。また⁵¹Crで標識した抗原ペプチド提示細胞に対するCTLの傷害性を測定する方法 (⁵¹Crリリースアッセイ、Int. J. Cancer, 58:p317,

25

1994)によっても調べることができる。

さらに、候補ペプチドを提示すると考えられるタイプのHLA抗原のcDNAを発現する発現プラスミドを、例えばCOS-7細胞(ATCC No. CRL1651)やVA-13細胞(理化学研究所細胞銀行)に導入した細胞に対して候補ペプチドをパルスし、
5 この細胞に対して前記CTLを反応させ、該CTLが産生する種々のサイトカイン(例えばIFN- γ)の量を測定することによっても、調べることができる
(J. Exp. Med., 187: 277, 1998)。

以上のような種々の活性測定の実施例は、後述の実施例7、実施例10および実施例12に記載されている。

10 なお、サイクロフィリンBはHLA-A24やHLA-A2に拘束性の腫瘍抗原ペプチド部分を有している。HLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチドを選択する場合には、前記HLA抗原をコードするcDNAとしてはHLA-A24のcDNA(Cancer Res., 55: 4248-4252 (1995)、Genbank Accession No. M64740)を用い、前記CTLとしては、ヒトの末梢血リンパ球のペプチド刺激により調製される場合の他、KG-CTL(FERM
15 BP-6725)などのCTLを用いることにより、前記の腫瘍抗原ペプチドの同定を行うことができる。また、HLA-A2拘束性の腫瘍抗原ペプチドを選択する場合には、HLA-A2のcDNA(Genbank Accession No. M84379)を用いる以外は前記と同様の手法により、当該腫瘍抗原ペプチドを同定することができる。

20 以上のような腫瘍抗原ペプチドの配列の規則性(モチーフ)が判明している場合と異なり、例えばHLA-A26のようにそのペプチドのモチーフが明らかでない場合は、該HLA-A26と腫瘍抗原ペプチドとの複合体を認識するCTL株が存在する場合には、例えばW097/46676に記載の方法に準じて本発明の腫瘍抗原ペプチドを同定することができる。

25 なお、以上述べたような腫瘍抗原ペプチドの同定法を、以下、“腫瘍抗原ペプチドのアッセイ法”と総称することもある。

前記したように、HLA-A24に結合して提示される腫瘍抗原ペプチドの配列には規則性(モチーフ)があり、具体的には、8~11アミノ酸よりなるペプチドのうちの第2位のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニン又はトリプトファンであり、C末端のアミノ酸がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、

トリプトファン又はメチオニンとなることが知られている (J. Immunol., 152, p3913, 1994, Immunogenetics, 41:p178, 1995, J. Immunol., 155:p4307, 1994)。また、HLA-A2に結合して提示される腫瘍抗原ペプチドの配列にも同様の規則性 (モチーフ) があり、具体的には前記表 1 に示したモチーフが知られている

5 (Immunogenetics, 41, p178, 1995, J. Immunol., 155:p4749, 1995)。従って、本発明の腫瘍抗原ペプチドのうち、HLA-A24およびHLA-A2拘束性の腫瘍抗原ペプチドとしては、サイクロフィリンBのアミノ酸配列上、以上のようなモチーフ構造に関わる部分ペプチドであって、かつ各HLA抗原と結合してCTLにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチドが例示される。

10 前記HLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチドとしては、具体的には、例えば配列番号：1～配列番号：11のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含むペプチドであって、かつHLA-A24抗原と結合してCTLにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチドが例示される。また、HLA-A2拘束性の腫瘍抗原ペプチドとしては、具体的には、例えば配列番号：12～配列番号：36のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含むペプチドであって、かつHLA-A2抗原と結合し

15 てCTLにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチドが例示される。

すなわち、

1) 配列番号：1～配列番号：36のいずれかに記載のアミノ酸配列よりなるペプチド、

20 2) 配列番号：1～配列番号：36のいずれかに記載のアミノ酸配列の全長を含み、該アミノ酸配列よりN末端方向及び／又はC末端方向に長いペプチド、または配列番号：1～配列番号：36のいずれかに記載のアミノ酸配列の連続した一部分よりなるペプチド、

であって、かつ各HLA抗原と結合してCTLにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチドが挙げられる。ここで、前記2)のペプチドの長さとしては、各HLA抗原に結合して提示されるという観点から、8～11アミノ酸程度のものが挙げられる。

25

本発明のHLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチドの好適なものとしては、配列番号：1または配列番号：2に記載のアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつHLA-A24抗原と結合してCTLにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチドが挙げら

れる。すなわち、

- 1) 配列番号：1または配列番号：2に記載のアミノ酸配列よりなるペプチド、
- 2) 配列番号：1または配列番号：2に記載のアミノ酸配列の全長を含み、該アミノ酸配列よりN末端方向及び／又はC末端方向に長いペプチド、または配列番号：1または配列番号：2に記載のアミノ酸配列の連続した一部分よりなるペプチド、

であって、かつHLA-A24抗原と結合してCTLにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチドが挙げられる。ここで、前記2)のペプチドの長さとしては、HLA-A24抗原に結合して提示されるという観点から、8～11アミノ酸程度のものが挙げられる。

本発明において「腫瘍抗原ペプチドと機能的に同等の特性を有する誘導体」（以下、腫瘍抗原ペプチド誘導体と略す場合がある）とは、本発明の腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列に対し、1又はそれ以上、好ましくは1～数個のアミノ酸残基の改変を施した改変体であって、かつHLA抗原と結合してCTLにより認識され得るという腫瘍抗原ペプチドとしての特性を有するものを指す。すなわち、本発明の腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列に対して1又はそれ以上のアミノ酸残基の改変を施した改変体であって、かつHLA抗原と結合してCTLにより認識され得るという腫瘍抗原ペプチドとしての活性を有するものは、全て、本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体の範疇に含まれる。

ここで、アミノ酸残基の「改変」とは、アミノ酸残基の置換、欠失、及び／又は付加（ペプチドのN末端、C末端へのアミノ酸の付加も含む）を意味し、好ましくはアミノ酸残基の置換が挙げられる。アミノ酸残基の置換に係る改変の場合、置換されるアミノ酸残基の数および位置は、腫瘍抗原ペプチドとしての活性が維持される限り、任意であるが、前記したように通常、腫瘍抗原ペプチドの長さが8～14アミノ酸程度であることから、1個から数個の範囲が好ましい。

本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体の長さとしては、前記腫瘍抗原ペプチドと同様に8～14アミノ酸程度が好ましい（ただしHLA-DR、-DP、-DQについては、14アミノ酸以上の長さの場合もある。）

以上のような本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体は、本発明の腫瘍抗原ペプチド

の一部を改変した改変体を前記ペプチド合成法に基づき合成し、これを前記腫瘍抗原ペプチドのアッセイ法に供することにより、同定することができる。

5 先に記載したように、HLA-A1, -A0201, -A0204, -A0205, -A0206, -A0207, -A11, -A24, -A31, -A6801, -B7, -B8, -B2705, -B37, -Cw0401, -Cw0602などのHLAの型については、該HLAに結合して提示される抗原ペプチドの配列の規則性（モチーフ）が判明している。従って、該モチーフに基づき、本発明の腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸を改変した腫瘍抗原ペプチド誘導体を作製することが可能である。

10 例えばHLA-A24に結合して提示される抗原ペプチドのモチーフとしては、前記したように、8～11アミノ酸よりなるペプチドのうちの第2位のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニン又はトリプトファンであり、C末端のアミノ酸がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン又はメチオニンであることが知られている（J. Immunol., 152, p3913, 1994, Immunogenetics, 41:p178, 1995, J. Immunol., 155:p4307, 1994）。またHLA-A2の場合、
15 前記の表1に記載のモチーフが知られている。また、該モチーフ上とり得るアミノ酸に類似の性質を持つアミノ酸残基も、許容される可能性がある。従って、本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体の例として、これらモチーフ上アミノ酸の置換が可能な位置（HLA-A24、HLA-A2においては第2位とC末端）にあるアミノ酸残基を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列の全部又は一部を含むものであって、
20 かつHLA抗原と結合してCTLにより認識されるという活性を持つペプチド誘導体が挙げられる。好ましくは、該位置において、前記モチーフ上知られたアミノ酸残基の中から置換するアミノ酸残基を選択したアミノ酸配列の全部または一部を含むペプチドであって、かつ前記活性を有する腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられる。なお「全部又は一部」の長さとしては、8～14アミノ酸程度の長さが好ましい（ただしHLA-DR, -DP, -DQについては、14アミノ酸以上の長さの場合
25 もある）。

ここで、HLA-A24またはHLA-A2に拘束性の腫瘍抗原ペプチドの誘導体としては、例えばサイクロフィリンBのアミノ酸配列上HLA-A24またはHLA-A2の結合モチーフを有するペプチドに対して、前記モチーフ上アミノ酸の置換が可能な位置、す

なわち第2位および／またはC末端のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換したアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつ前記活性を有する腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられ、好ましくは、第2位および／またはC末端のアミノ酸残基を前記モチーフ上知られたアミノ酸残基に置換したアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつ前記活性を有する腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられる。該HLA-A24またはHLA-A2拘束性の腫瘍抗原ペプチド誘導体において「全部又は一部」の長さとしては、8～11アミノ酸程度が好ましい。

具体的には、例えば配列番号：1～配列番号：36のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位および／またはC末端のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換したアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつ前記活性を有する腫瘍抗原ペプチド誘導体が例示される。好ましくは、配列番号：1～配列番号：36のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位および／またはC末端のアミノ酸残基を前記モチーフ上知られたアミノ酸残基に置換したアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつ前記活性を有する腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられる。すなわちHLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチド誘導体に関しては、配列番号：1～配列番号：11のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位のアミノ酸残基をチロシン、フェニルアラニン、メチオニン又はトリプトファンに置換し、および／またはC末端のアミノ酸残基をフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン又はメチオニンに置換したアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつ前記活性を有する腫瘍抗原ペプチド誘導体が例示される。またHLA-A2拘束性の腫瘍抗原ペプチド誘導体に関しては、配列番号：12～配列番号：36のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位のアミノ酸残基をロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンに置換し、および／またはC末端のアミノ酸残基をバリンまたはロイシンに置換したアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつ前記活性を有する腫瘍抗原ペプチド誘導体が例示される。

本発明のHLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチド誘導体の好適なものとしては、配列番号：1または配列番号：2に記載のアミノ酸配列の第2位および／またはC末端のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換したアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつ前記活性を有する腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられる。より好

ましくは、前記モチーフに基づきアミノ酸を置換したもの、すなわち配列番号：37または配列番号：38に記載のアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつ前記活性を有する腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられる。このような腫瘍抗原ペプチド誘導体の好適な例を、配列番号：39～配列番号：40に示す。

- 5 さらに、最初に記載したように前記のようなサイクロフィリンBの他、サイクロフィリンBのホモログであるサイクロフィリンA、サイクロフィリンCおよびサイクロフィリンDも同様に腫瘍抗原ペプチドを生ずる腫瘍抗原タンパク質である。これら腫瘍抗原ペプチドの具体例としては、配列番号：41（サイクロフィリンA）、配列番号：42（サイクロフィリンC）および配列番号：43（サイクロフィリンD）などのHLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチドが挙げられる。

10 本発明の腫瘍抗原ペプチド又はその誘導体は、以下のように腫瘍の治療剤または予防剤として使用することができる。

- 15 すなわち、腫瘍の治療又は予防を目的とする使用に際しては、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体の少なくとも1種または2種以上を組み合わせ、要すれば他の腫瘍抗原ペプチド等と組み合わせて患者に投与する。本発明の腫瘍抗原ペプチド又はその誘導体を有効成分とする腫瘍の治療剤または予防剤をサイクロフィリンB陽性の患者に投与すると、抗原提示細胞のHLA抗原に腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体が高密度に提示され、提示されたHLA抗原複合体特異的CTLが増殖して腫瘍細胞を破壊することができ、従って、患者の腫瘍を治療し、又は腫瘍の増殖・転移を予防することができる。さらに、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体を有効成分とする腫瘍の治療剤又は予防剤は、従来の化学療法や放射線療法と併用することにより、治療効果を上げることも可能である。

- 20 本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体を有効成分とする腫瘍の治療剤または予防剤は、細胞性免疫が効果的に成立するようにアジュバントとともに投与したり、粒子状の剤型にして投与することができる。アジュバントとしては、文献（Clin. Microbiol. Rev., 7:277-289, 1994）に記載のものなどが応用可能である。また、リポソーム製剤、直径数 μm のビーズに結合させた粒子状の製剤、リピッドを結合させた製剤なども考えられる。投与方法としては、皮内投与、皮下

投与、静脈注射などが考えられる。製剤中の本発明の腫瘍抗原ペプチドあるいはその誘導体の投与量は、治療すべき疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常0.0001mg～1000mg、好ましくは0.001mg～1000mg、より好ましくは0.1mg～10mgであり、これを数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

さらに、本発明の腫瘍抗原ペプチドの由来であるサイクロフィリンBタンパク質あるいは該サイクロフィリンBをコードする遺伝子もまた、腫瘍の治療剤または予防剤として使用することができる。ここで、サイクロフィリンBおよびその遺伝子は全長のみならず、その一部分であっても、また当該一部分が連結したものであっても、さらにはその塩基配列又はアミノ酸配列に改変の施されたものであっても、HLA抗原と結合してCTLにより認識され得るペプチド部分を少なくとも一つ含んでさえいれば、目的とする腫瘍の治療または予防を達成することができる。ここで、この「HLA抗原と結合してCTLにより認識され得るペプチド部分を少なくとも1つ含む」ものを、本発明においては「部分ポリペプチド」と称する。

サイクロフィリンBタンパクまたはその部分ポリペプチドを腫瘍の治療剤または予防剤として適用する際には、前記腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体と同様の投与形態、投与方法および投与量により、投与することができる。サイクロフィリンBタンパクまたはその部分ポリペプチドを腫瘍患者に投与すると、抗原提示細胞内に取り込まれ、その後、細胞内分解を受けて生じた腫瘍抗原ペプチドがHLA抗原と結合して複合体を形成し、該複合体が抗原提示細胞表面に高密度に提示され、この複合体に特異的なCTLが体内で効率的に増殖し、腫瘍細胞を破壊する。以上のようにして、腫瘍の治療又は予防が達成される。

また、サイクロフィリンBまたはその部分ポリペプチドをコードする遺伝子を腫瘍の治療剤または予防剤として適用する際には、以下の方法が使用され得る。

すなわち、本発明の遺伝子を投与し細胞内に導入する方法としては、ウイルスベクターによる方法およびその他の方法（日経サイエンス，1994年4月号，20-45頁、月刊薬事，36(1)，23-48(1994)、実験医学増刊，12(15)，(1994)、およびこれらの引用文献等）のいずれの方法も適用することができる。

ウイルスベクターによる方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス等のDNAウイルス又はRNAウイルスに本発明のDNAを組み込んで導入する方法が挙げられる。この中で、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルス等を用いた方法が特に好ましい。

その他の方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法（DNAワクチン法）、リポソーム法、リポフェクチン法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられ、特にDNAワクチン法、リポソーム法が好ましい。

本発明の遺伝子を実際に医薬として作用させるには、当該遺伝子を直接体内に導入する *in vivo*法、およびヒトからある種の細胞を採集し体外でDNAを該細胞に導入しその細胞を体内に戻す *ex vivo*法がある（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1)、23-48(1994)、実験医学増刊、12(15)、(1994)、およびこれらの引用文献等）。*in vivo*法がより好ましい。

*in vivo*法により投与する場合は、治療目的の疾患、症状等に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内等に投与することができる。*in vivo*法により投与する場合は、例えば、液剤等の製剤形態をとりうるが、一般的には有効成分である本発明のDNAを含有する注射剤等とされ、必要に応じて、慣用の担体を加えてもよい。また、本発明の遺伝子を含有するリポソームまたは膜融合リポソーム（センダイウイルス（HVJ）ーリポソーム等）においては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤の形態とすることができる。

製剤中の本発明の遺伝子の含量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常、0.0001mg～100mg、好ましくは0.001mg～10mgの本発明の遺伝子を、数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

以上のような本発明の遺伝子の腫瘍患者への投与により、抗原提示細胞内で腫瘍抗原タンパク質が高発現する。その後、細胞内分解を受けて生じた腫瘍抗原ペプチドがHLA抗原と結合して複合体を形成し、該複合体が抗原提示細胞表面に

高密度に提示され、この複合体特異的なCTLが体内で効率的に増殖し、腫瘍細胞を破壊する。以上のようにして、腫瘍の治療又は腫瘍の増殖・転移の予防が達成される。

なお、以上のように治療剤として使用され得るサイクロフィリンBおよびその部分ポリペプチド、およびこれらの物質をコードする遺伝子は、以下のようにして製造することができる。すなわち、サイクロフィリンBをコードする遺伝子は、WWW Entrezデータベース検索においてGenbank Accession No. M60857として登録されているヒトサイクロフィリンBのcDNAの塩基配列をもとに適当なPCRプライマーを作製し、例えばMolecular Cloning 2nd Edt. Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)等の基本書に従ってPCR反応を行うことなどにより、容易にクローニングできる。その際、当該サイクロフィリンBのクローニングに関する文献であるProc. Natl. Acad. Sci, U. S. A. 88:p1903, 1991も参考にすることができる。さらに、市販のサイクロフィリンBcDNAクローン(ATCC No. 107758, Designations: HTNAQ 10)も使用できる。また、改変を施す場合は前記Molecular Cloning等の基本書を参考にして容易に行うことができる。さらに、このようにしてクローニングされたヒトサイクロフィリンBをコードする遺伝子を用いてサイクロフィリンBタンパクを発現させる方法としては、例えば、前述のMolecular Cloning等の多くの成書や文献に基づいて実施することができる。発現させたいDNAの上流に、場合によっては転写を制御するプロモーター配列(例えば、trp、lac、T7、SV40初期プロモーター)等の制御遺伝子を付加し、適当なベクター(例えばpSV-SPORT1など)に組み込むことにより、宿主細胞内で複製し、機能する発現プラスミドを作製する。次に発現プラスミドを適当な宿主細胞に導入して形質転換体を得る。宿主細胞としては、大腸菌などの原核生物、酵母のような単細胞真核生物、昆虫、動物などの多細胞真核生物の細胞などが挙げられる。また、宿主細胞への遺伝子導入法としては、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、電気パルス法などがある。形質転換体は、適当な培地で培養することによって目的とするタンパク質を生産する。以上のようにして得られた腫瘍抗原タンパク質は一般的な生化学的方法によって単離精製することができる。

以上のようにして作製されたサイクロフィリンBタンパクおよびその部分ポリペプチド、およびこれらの物質をコードする遺伝子が腫瘍抗原としての活性を有しているか否か、すなわち当該タンパクの細胞内分解により、HLA抗原と結合してCTLにより認識され得る腫瘍抗原ペプチドを生じるか否かは、例えば以下の

5 すなわちまず、アフリカミドリザル腎臓由来のCOS-7 (ATCC CRL1651) や繊維芽細胞VA-13 (理化学研究所細胞開発銀行) といった腫瘍抗原タンパク質を発現していない細胞に対し、候補となる遺伝子又は遺伝子断片を有する発現プラスミドと、HLA抗原をコードするDNAを有する発現プラスミドとをダブルトランス
10 フェクトする。該トランスフェクトは、例えばリポフェクトアミン試薬 (GIBCO BRL社製) を用いたりポフェクチン法などにより行うことができる。その後、用いたHLA抗原に拘束性の腫瘍反応性のCTLを加えて作用させ、該CTLが反応して産生する種々のサイトカイン (例えばIFN- γ) の量を、例えばELISA法
15 などで測定することによって、候補遺伝子が腫瘍抗原タンパク質をコードするDNAであるか否かを調べることができる。なお、サイクロフィリンBはHLA-A24
 やHLA-A2に拘束性の腫瘍抗原ペプチド部分を有しているため、前記HLA抗原をコードするDNAとしてはHLA-A24のcDNA (Cancer Res., 55: 4248-4252
 (1995)、Genbank Accession No.M64740) やHLA-A2のcDNA (Genbank
 Accession No.M84379) が挙げられ、前記CTLとしては、ヒトの末梢血リンパ
20 球より調製される場合の他、KG-CTL (FERM BP-6725) などのCTLが挙げられる。

以上のような活性測定の実施例は、後述の実施例2に記載されている。

本発明においては、本発明の腫瘍抗原ペプチドあるいはその誘導体に特異的に結合する抗体も含まれる。該抗体は、例えば、Antibodies; A Laboratory
25 Manual, Lane, H, D.ら編, Cold Spring Harbor Laboratory Press出版 New York 1989などに記載の方法により容易に作製される。即ち、本発明の腫瘍抗原ペプチドあるいはその誘導体を用いて常法により適宜動物を免疫することにより、腫瘍抗原ペプチドあるいはその誘導体を認識する抗体、さらにはその活性を中和する抗体が容易に作製できる。抗体の用途としては、アフィニティークロマトグ

ラフィー、免疫学的診断等が挙げられる。

該抗体を用いて前記免疫学的診断を行うには、まず前記抗体を必要に応じて適宜標識し、これを用いて腫瘍が疑われる患者から得た試料（例えば血液、腫瘍組織など）中の抗原の存在を検出することにより、腫瘍の有無を診断することができる。具体的には、イムノブロット法、放射免疫測定法（R I A）、酵素免疫測定法（E L I S A）、蛍光あるいは発光測定法等より適宜選択できる。

本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体、あるいは腫瘍抗原タンパク質（サイクロフィリンB）またはその遺伝子は、腫瘍患者の治療において、以下のようにin vitroで利用することも可能である。

すなわち、腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体、または腫瘍抗原タンパク質またはその遺伝子を腫瘍の治療に用いる場合、患者の体内で効率良く特異的なC T Lを誘導することの可能な投与法が重要になる。そのための手段のひとつとして、本発明は、腫瘍患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞の表面に、H L A抗原と本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を提示させた抗原提示細胞、および該抗原提示細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤を提供するものである。

ここで「抗原提示能を有する細胞」とは、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体を提示することの可能なH L A抗原を細胞表面に発現している細胞であれば特に限定されないが、特に抗原提示能が高いとされる樹状細胞が好ましい。

また、前記抗原提示能を有する細胞から本発明の抗原提示細胞を調製するために添加される物質としては、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体のみならず、腫瘍抗原タンパク質であるサイクロフィリンBまたはその遺伝子であっても良い。ここでサイクロフィリンBおよびその遺伝子は、全長のみならず、その部分ポリペプチドおよびその遺伝子であっても、本発明の抗原提示細胞を調製することができる。その際、タンパクまたは遺伝子の形態で使用する場合には細胞内に取り込まれる必要がある。これについては、前記遺伝子およびタンパク質を有効成分とする腫瘍の治療剤または予防剤の項を参照されたい。

本発明の抗原提示細胞は、腫瘍患者から抗原提示能を有する細胞を単離し、該細胞に本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体、あるいは腫瘍抗原タンパク

質またはその部分ポリペプチドを体外でパルスしてHLA抗原と前記腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を作製することにより得られる(Cancer Immunol. Immunother., 46:82, 1998、J. Immunol., 158:p1796, 1997、Cancer Res., 59:p1184, 1999)。樹状細胞を用いる場合は、例えば、腫瘍患者の末梢血からフィコール法によりリンパ球を分離し、その後非付着細胞を除き、付着細胞をGM-CSFおよびIL-4存在下で培養して樹状細胞を誘導し、当該樹状細胞を本発明の腫瘍抗原ペプチドまたは腫瘍抗原タンパク質等と共に培養してパルスすることなどにより、本発明の抗原提示細胞を調製することができる。詳しくは実施例13を参照されたい。

また、前記抗原提示能を有する細胞に本発明の腫瘍抗原タンパクまたはその部分ポリペプチドをコードする遺伝子を導入することにより本発明の抗原提示細胞を調製する場合は、当該遺伝子は、DNAの形態であっても、RNAの形態であっても良い。具体的には、DNAの場合は Cancer Res., 56:p5672, 1996や J. Immunol., 161: p5607, 1998などを参考にして行うことができ、またRNAの場合は J. Exp. Med., 184: p465, 1996などを参考にして行うことができる。

前記抗原提示細胞を有効成分として含有する腫瘍の治療剤は、抗原提示細胞を安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与が挙げられる。このような抗原提示細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤を患者の体内に戻すことにより、サイクロフィリンB陽性の患者の体内で効率良く特異的なCTLが誘導され、腫瘍を治療することができる。なお、HLA-A24に陽性の腫瘍患者に対してはHLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチドあるいはその誘導体を使用するといった、患者と使用するペプチドとでHLAの型を合わせる必要のあることは言うまでもない。

さらに、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体、あるいは腫瘍抗原タンパク質またはその遺伝子のイン・ビトロでの利用法として、以下の養子免疫療法における利用が挙げられる。

すなわちメラノーマにおいては、患者本人の腫瘍内浸潤T細胞を体外で大量に培養して、これを患者に戻す養子免疫療法に治療効果が認められている

(J. Natl. Cancer. Inst., 86:1159、1994)。またマウスのメラノーマにおいては、脾細胞をイン・ビトロで腫瘍抗原ペプチドTRP-2で刺激し、腫瘍抗原ペプチドに特異的なCTLを増殖させ、該CTLをメラノーマ移植マウスに投与することにより、転移抑制が認められている(J. Exp. Med., 185:453, 1997)。これは、
5 抗原提示細胞のHLA抗原と腫瘍抗原ペプチドとの複合体を特異的に認識するCTLをイン・ビトロで増殖させた結果に基づくものである。従って、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体、あるいは腫瘍抗原タンパク質またはその遺伝子を用いて、イン・ビトロで患者末梢血リンパ球を刺激して腫瘍特異的CTLを増やした後、このCTLを患者に戻す治療法は有用であると考えられる。

すなわち本発明は、前記HLA抗原と本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を特異的に認識するCTL、および、該CTLを有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤をも提供するものである。該治療剤は、CTLを安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与が挙げ
10 られる。このようなCTLを有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤を患者の体内に戻すことにより、サイクロフィリンB陽性の患者の体内でCTLによる腫瘍細胞の傷害作用が促進され、腫瘍細胞を破壊することにより、腫瘍を治療することができる。

本発明の腫瘍抗原タンパク質、腫瘍抗原ペプチドおよびその誘導体はまた、腫瘍を診断するための診断薬の有効成分とすることができる。すなわち、本発明の腫瘍抗原タンパク質、腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体そのものを診断薬として用い、腫瘍が疑われる患者から得た試料(例えば血液、腫瘍組織など)中の抗体の存在を検出することにより、腫瘍の早期発見、再発、転移を診断することが可能である。また本発明の腫瘍抗原タンパク質、腫瘍抗原ペプチドなどを有効成分とする医薬の適応可能な腫瘍患者の選択にも利用できる。具体的には、イムノ
20 ブロット法、RIA、ELISA、蛍光または発光測定法などを用いることにより、当該診断を行うことができる。

さらに近年、抗原ペプチドとHLA抗原との複合体を用いて抗原特異的CTLを検出する新しい検出方法が確立された(Science, 274:p94, 1996)。本発明の腫

瘍抗原ペプチドまたはその誘導体とHLA抗原との複合体を前記検出方法に供し、腫瘍抗原特異的CTLを検出することにより、腫瘍の早期発見、再発、転移を診断することができる。また本発明の腫瘍抗原タンパク質、腫瘍抗原ペプチド等を有効成分とする医薬の適応可能な腫瘍患者の選択や、当該医薬による治療効果の判定などにも利用できる。すなわち本発明においては、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体を有効成分の一部として含有する、腫瘍の診断薬をも提供するものである。

具体的には、文献（Science, 274:p94, 1996）に記載の方法に従って蛍光標識したHLA抗原と腫瘍抗原ペプチドとの複合体の4量体を作製し、これを用いて腫瘍が疑われる患者の末梢血リンパ球中の抗原ペプチド特異的CTLをフローサイトメーターにより定量することにより、前記診断を行うことができる。

本発明はまた、肺腺癌由来の腫瘍内浸潤リンパ球から樹立されたCTLである、KG-CTL（受託番号 FERM BP-6725）をも提供するものである。当該KG-CTLは、HLA-A24およびHLA-A2陽性の癌細胞株に反応することが明らかとなっており、本発明のサイクロフィリンBも、当該KG-CTLへの反応性を指標として見出された腫瘍抗原タンパク質である。従って、KG-CTLを利用することにより、サイクロフィリンBと同様に、新たな腫瘍抗原タンパク質および腫瘍抗原ペプチドを見出すことができる。具体的には、後述の実施例2を参照されたい。

図面の簡単な説明

図1は、HLA-A2402 cDNAの組換えプラスミドあるいはHLA-A2601 cDNAの組換えプラスミドを導入したCOS-7細胞に対して本発明の腫瘍抗原ペプチド「84-92（配列番号：1）」を添加した後、KG-CTLと共に培養し、KG-CTLが産生したIFN- γ 量を測定した結果を示すグラフである。横軸は添加したペプチド濃度を、縦軸はKG-CTLが産生したIFN- γ 量を示す。

図2は、HLA-A2402 cDNAの組換えプラスミドあるいはHLA-A2601 cDNAの組換えプラスミドを導入したCOS-7細胞に対して本発明の腫瘍抗原ペプチド「91-99（配列番号：2）」を添加した後、KG-CTLと共に培養し、KG-CTLが産生したIFN- γ 量を測定した結果を示すグラフである。横軸は添加したペプチド濃度を、縦軸は

KG-CTLが産生したIFN- γ 量を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

5 実施例 1

肺腺癌由来の腫瘍内浸潤リンパ球 (TIL) からの細胞傷害性T細胞 (CTL) 株の樹立

肺腺癌患者の手術検体を培養液中で細切した後、コラゲナーゼ及びDNAaseを含む培養液中で攪拌して細胞を分散させた。細胞分散液からFicoll Conray溶液を用いて、比重遠心法によりリンパ球を分離した。リンパ球は、24穴プレートを用い、45%RPMI-1640、45%AIM-V (GIBCO BRL社)、10%FCSに、100U/mlインターロイキン-2、0.1mM NEAA (GIBCO BRL社製) を添加した培養液 (以下、リンパ球培養液と呼ぶ) で培養した。培養開始から2日間は、培養液中に抗CD3抗体のNU-T3 (ニチレイ社製) を1 μ g/ml添加した。30日以上培養を続け、HLA-A24またはHLA-A2陽性の何種類かの癌細胞株に反応するCTL株を樹立し、KG-CTLと命名して以下の実験に使用した。各種癌細胞株に対するKG-CTLの反応性は、96穴プレートに癌細胞株を1 $\times 10^4$ 個/穴植え込み、翌日にKG-CTLを1 $\times 10^5$ 個/穴添加して、更に18時間培養した後、培養液を回収してKG-CTLが産生したインターフェロン- γ (IFN- γ) 量を測定することにより調べた。IFN- γ の定量は、エンザイムイムノアッセイ (ELISA) により行った。すなわち、96穴プレートに固相化抗体として抗ヒトIFN- γ マウスモノクローナル抗体を吸着させ、ウシ血清アルブミンで非特異的結合をブロックした後、検体中のIFN- γ を抗体に結合させた。次に検出抗体として抗ヒトIFN- γ ウサギポリクローナル抗体を結合させ、さらにアルカリフォスファターゼ標識した抗ウサギイムノグロブリンヤギ抗体 (アマシャム社製) を結合した後、ペルオキシダーゼ発色キットT (住友ベークライト社製) を用いて発色させた後、吸光度 (405nm) を測定した。これをスタンダードのIFN- γ で得られた値と比較することにより定量した。表2に、各種腺癌細胞株に対するKG-CTLの反応性を示す。また、表3にリンパ球系細胞株に対するKG-CTLの反応性を示す。

表2

腺癌細胞株名称	KG-CTLが産生したIFN- γ 量(pg/ml)	HLA-Aタイプ
HT-1376 (膀胱癌細胞株)	4608	2402/2402
1-87 (肺癌細胞株)	194	0207/1101
11-18 (肺癌細胞株)	4632	0201/2402
5 PC-9 (肺癌細胞株)	1102	0206/2402
LC-1 (肺癌細胞株)	129	3101/3302
YT-803 (肺癌細胞株)	285	3101/3302
143B (骨肉腫細胞株)	1547	0211/0211
なし(KG-CTLのみ)	100	—

10 表 3

細胞株	KG-CTLが産生したIFN- γ 量(pg/ml)	HLA-Aタイプ
SSB (B細胞株 ¹⁾)	5769	2402/2402
Ban-B1 (B細胞株 ¹⁾)	78	3101/3302
HPB-MLT (白血病細胞株)	189	0101/0201
15 MOLT-16 (白血病細胞株)	13	2301/3002
MT-2 (白血病細胞株)	3495	2402/2402
なし(KG-CTLのみ)	0	—

¹⁾健常人のB細胞をEBウイルスでトランスフォームしたB細胞株

20 表2の結果より、KG-CTLは、表中のHLA-A2402陽性の癌細胞 (HT-1376、11-18、PC-9) に強く反応してIFN- γ を産生すること、HLA-A2陽性の癌細胞 (143B) にも反応してIFN- γ を産生することが示された。また表3の結果より、KG-CTLは、HLA-A2402陽性のEBウイルスでトランスフォームしたB細胞株や白血病細胞株 (SSB、MT-2) に強く反応すること、HLA-A2陽性の白血病細胞 (HPB-MLT) に対しても反応することが明らかになった。

25 樹立された KG-CTLは、茨城県つくば市東1丁目1番3号、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている (微生物の表示: KG-CTL; 受領日: 平成10年6月19日; 受託番号: FERM P-16854) (国際寄託への変更日: 平成11年5月20日; 受託番号: FERM BP-6725)。なお、中尾ら著、Cancer Res., 55:4248-4252(1995)記載の方法に従い、KG-CTLのHLA分子のタイピングを行った結果 (塩野義製薬

(株)により実施)、AローカスはA0206及びA2402であることが確認された。

実施例 2

腫瘍抗原タンパク質の同定

5 実施例 1 でKG-CTLが強く反応した膀胱癌細胞株HT-1376 (ATCC番号CRL1472) から以下の方法によりcDNAライブラリーを作製した。

まず、HT-1376からmRNA精製システム (ファルマシアバイオテク社製) を用い、添付のプロトコールに従い、全RNA画分の分離および oligo(dT) カラムによる poly(A)⁺mRNA の調製を行った。mRNA よりスーパースクリプトプラスミドシステム (GIBCO BRL社製) を用い添付のプロトコールに従い、両端にNotIアダプターとSalIアダプターを連結した cDNA を作製した後、この cDNA を発現ベクターのプラスミドpSV-SPORT1 (GIBCO BRL 社製) の制限酵素NotIおよびSalIの切断部位にライゲーションにより連結して組換えプラスミドを得た。この組換えプラスミドをジーンパルサー (Bio-Rad社製) を用いて電気パルスにより大腸菌のエレクトロマックス DH10BTMセル (GIBCO BRL社製) に導入し、アンピシリン (50
10 μ g/ml) を含むLB培地 (1%バクトトリプトン、0.5%イーストエキス、0.5%NaCl、pH7.3) で組換えプラスミドが導入されている形質転換体を選択した。

この形質転換体の100個のプールからの組換えプラスミドDNAの回収は以下のように行った。すなわち、アンピシリン (50 μ g/ml) を含むLB培地の入った96ウェルU底マイクロプレートにウェルあたり 100個の形質転換体を加え培養後、その
20 一部をウェル当たり0.25mlのTYGPN培地 (F.M. Ausubelら編、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Inc.) の入った別の96ウェルU底マイクロプレートに移して37°Cで48時間培養し、残りのLB培地のマイクロプレートは凍結保存した。TYGPN培地で培養した形質転換体の組換えプラスミドDNAは、マイクロプレートでアルカリ溶解法 (F.M. Ausubelら編、CURRENT PROTOCOLS IN
25 MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Inc.) により調製した。イソプロパノール沈澱で回収した組換えプラスミドDNAは、50 μ lの20ng/ml RNaseを含む10mM Tris, 1mM EDTA, pH7.4溶液で懸濁した。

一方、茨城県つくば市東1丁目1番3号、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている食道癌細胞株KE-4 (受領日: 平成9年5月23日;
30 受託番号: FERM BP-5955) から、中尾ら著、Cancer Res., 55: 4248-4252 (1995) の記載に従い、HLA-A2402 (Genbank Accession

No. M64740) およびHLA-A2601のcDNAを、発現ベクターpCR3 (INVITROGEN社製) に組み込んだ組換えプラスミドを作製した。

- 次に、アフリカミドリザルの腎臓由来の細胞株COS-7 (ATCC番号CRL1651) へ、リポフェクチン法により以下のようにHT-1376 cDNAの組換えプラスミドと
- 5 HLA-A2402 cDNAの組換えプラスミドをダブルトランスフェクトした。すなわち、COS-7を96ウェル平底マイクロプレートにウェル当たり8000個を加えて、100 μ lの10% FCSを含むRPMI1640培養液で1日間培養した。リポフェクトアミン試薬 (GIBCO BRL社製) を用い、形質転換体約100個分のHT-1376 cDNAの組換えプラスミド25 μ lとHLA-A2402 cDNAの組換えプラスミド10 μ l (200ng) と約50倍に希釈したリポフェクチン試薬35 μ lの混合液70 μ lのうち、30 μ l をCOS-7に加えて
- 10 ダブルトランスフェクトした。トランスフェクタントは2点ずつ用意した。5時間後、このトランスフェクタントに200 μ lの10% FCSを含む培養液を加え、更に48時間、37°Cで培養した後、培養液を除去し、ウェル当たり 1.5×10^5 個のKG-CTLを加えて100 μ lの10%FCSと25U/mlのIL-2を含む培養液で37°Cで24時間培養した。
- 15 培養後、培養液を回収し、実施例1に記載のELISA法にてIFN- γ 量を測定した。

- 高いIFN- γ 産生が認められた群については、該当する凍結保存してあったHT-1376 cDNAの組み換えプラスミドによる形質転換体約100個のプールを用いてさらに以下のようにスクリーニングを行った。すなわち、形質転換体のプールをアンピシリン (50 μ g/ml) を含むLB寒天培地のプレートにまいてコロニーを得て、
- 20 各群400コロニーについてウェル当たりの形質転換体が1種類となる条件で上記と同様の方法で培養し、HT-1376 cDNAの組換えプラスミドDNAを調製した。さらに上記と同様な方法で、COS-7へのHT-1376 cDNAの組換えプラスミドとHLA-A2402 cDNAの組換えプラスミドのダブルトランスフェクトを行い、引き続きKG-CTLとの混合培養を行い、KG-CTLが反応して産生した培養液中のIFN- γ の定量を行って陽性のプラスミドを選択した。この操作によりHT-1376 cDNA組換えプラスミドクローンが選択され、これを4F2と命名した。4F2については、さらにもう一度、同様な操作を繰り返してKG-CTLによるIFN- γ の産生量を測定した。その結果を以下の表4に示す。
- 25

表4

細胞	KG-CTLが産生したIFN- γ 量(pg/ml)
COS-7 + HLA-A2402	469
COS-7 + HLA-A2402 + 4F2	543

5 KG-CTLは、COS-7にHLA-A2402のみをトランスフェクトした細胞に対してよりも、COS-7にHLA-A2402と4F2とをダブルトランスフェクトした細胞に対して、より強く反応してIFN- γ を産生した。この結果から4F2がコードするタンパク質は、腫瘍抗原タンパク質であることが示された。

実施例 3

腫瘍抗原タンパク質遺伝子の塩基配列の決定

10 実施例 2 で得られた腫瘍抗原タンパク質をコードするプラスミドクローン4F2についてDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencingキット（パーキンエルマー社製）を使用して、その塩基配列を決定した。決定した塩基配列及び該塩基配列によりコードされるアミノ酸配列を、WWW Entrezデータベースを使用して既知の配列と比較した結果、プラスミドクローン4F2の塩基配列は、Genbank Accession

15 No. M60857に登録されているHuman cyclophilin B（ヒトサイクロフィリンB）のアミノ酸配列と同一であった。なお、該サイクロフィリンBの配列は、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 88:p1903, 1991にも記載されている。該サイクロフィリンBは免疫抑制剤であるサイクロスポリンAの結合タンパク質であり、生体内において免疫細胞の活性化に関与することが知られている。上記実施例 2 により、これまで免疫細胞の活性化への関与のみが知られていたサイクロフィリンB

20 に、腫瘍抗原タンパク質としての機能の存することが初めて明らかとなった。

実施例 4

候補ペプチドの選択

25 HLA分子に結合して提示される抗原ペプチドの配列には規則性（モチーフ）があり、HLA-A24の場合、8～11アミノ酸よりなるペプチドの第2位がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンあるいはトリプトファン、またC末端がフェニルアラニン、トリプトファン、ロイシン、イソロイシンあるいはメチオニンがモチーフとなることが知られている（Immunogenetics, 41:178, 1995、J. Immunol., 152:3913, 1994、J. Immunol., 155:4307, 1994）。またHLA-A2の場合、8～11ア

ミノ酸よりなるペプチドであり、HLA-A0201においては第2位がロイシンあるいはメチオニンであり、C末端がバリンあるいはロイシンであること、HLA-A0204においては第2位がロイシンでありC末端がロイシンであること、HLA-A0205においては第2位がバリン、ロイシン、イソロイシン又はメチオニンであり、C末端がロイシンであること、HLA-A0206においては第2位がバリンあるいはグルタミンであり、C末端がバリンあるいはロイシンであること、さらにHLA-A0207においては第2位がロイシンでありC末端がロイシンであることが知られている

(Immunogenetics, 41:p178, 1995、J. Immunol., 155:p4749, 1995、表1参照)。

このようなモチーフに従い、本発明者らが腫瘍抗原タンパク質として機能していることを見出したサイクロフィリンBのアミノ酸配列 (Genbank Accession No. M60857) から、上記モチーフを有する8~11アミノ酸よりなるペプチド部分を選択した。選択したHLA-A24の結合モチーフを有するペプチドを配列番号: 1~配列番号: 11に、またHLA-A2の結合モチーフを有するペプチドを配列番号: 12~配列番号: 36に示す。これらのペプチドは(株)バイオロジカに依頼し、Fmoc法にて合成を行った。

次にHLA-A2402 cDNAの組換えプラスミドを文献 (J. Exp. Med., 187:277, 1998) の記載に従い、 10^4 個のCOS-7細胞にリポフェクション法にてトランスフェクションしてHLA-A2402を発現させた。この細胞に対し、先に合成したHLA-A24の結合モチーフを有する各種ペプチドをそれぞれ $10 \mu\text{M}$ で2時間添加してパルスした後、 2×10^4 個のKG-CTLとともに18時間培養し、KG-CTLが産生した培養上清中のIFN- γ 量をELISA法にて測定した。その後、2種のペプチド、すなわちサイクロフィリンBのアミノ酸配列の第84位から第92位の配列よりなるペプチド (配列番号: 1、以下、該ペプチドを単に「84-92」と称することもある)、及び第91位から第99位の配列よりなるペプチド (配列番号: 2、以下、該ペプチドを単に「91-99」と称することもある) を以下の実験に供した。

実施例 5

Lys-Phe-His-Arg-Val-Ile-Lys-Asp-Phe
(配列番号: 1) の合成

樹脂はFmoc-Phe-Alko Resin (0.56 mmol/g 、1

00-200 mesh) を用いた。この樹脂 100 mg を用いて、後記スケジュール 1 に従って合成を開始し、Fmoc-Asp (OtBu)-OH, Fmoc-Lys (Boc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Arg (Pmc)-OH, Fmoc-His (Trt)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Lys (Boc)-OH を順次カップリングさせた。カップリングの後、以下の表 5 に示したスケジュール 1 の工程 3 まで行い、その結果、ペプチド樹脂が得られた。

このペプチド樹脂に Reagent K (5% フェノール、5% チオアニソール、5% H₂O、2.5% エタンジチオール/TFA 溶液) 2 ml を加え、室温で 2.5 時間反応させた。氷冷下反応液にジエチルエーテル 10 ml を加え 10 分攪拌し、濾過しジエチルエーテル 10 ml で洗浄した。濾上物に 10% 酢酸水溶液 (以下酢酸水という) 10 ml を加えて 30 分間攪拌後、樹脂を濾別し、酢酸水 4 ml で洗浄した。濾洗液を凍結乾燥後、得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め 0.1% TFA 水で平衡化させた逆相系充填剤 COSMOSIL 5C18-AR カラム (25 φ × 250 mm) に注入し、カラムを 0.1% TFA 水で洗浄後、アセトニトリル濃度を 260 分で 25% まで増加させ、流速 7 ml/min. で溶出した。溶出液を A220 nm でモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、Lys-Phe-His-Arg-Val-Ile-Lys-Asp-Phe 11.7 mg を得た。

得られた Lys-Phe-His-Arg-Val-Ile-Lys-Asp-Phe は、逆相系充填剤 YMC-PACK ODS-AM カラム (4.6 φ × 250 mm) を用いた、0% から 60% までの 0.1% TFA を含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間 23.9 分を示し、そのアミノ酸分析値および質量分析値は理論値と一致した。

アミノ酸分析

加水分解：1% フェノール / 6N 塩酸水溶液、110℃、24 時間

分析法：ニンヒドリン法

* 基準アミノ酸 () 内理論値

Asx : 1.01 (1)

*Val : 1.00 (1)
 Ile : 0.85 (1)
 Phe : 1.94 (2)
 Lys : 1.74 (2)
 5 His : 0.95 (1)
 Arg : 0.86 (1)

質量分析 (FAB)

$[M+H]^+ : 1190$

表 5

10 スケジュール 1

	工程	時間 (分) × 処理回数
	1. (洗浄) DMF 1.2 ml	1 × 2
	2. (脱保護) 50% ピペリジン / DMF	12 × 1
	3. (洗浄) DMF 1.2 ml	1 × 7
15	4. (カップリング) 各アミノ基保護アミノ酸 (5 当量) / NMP 溶液 0.9 ml、DIC (5 当量) / NMP 溶液 0.3 ml	30 × 1
	5. (洗浄) DMF 1.2 ml	1 × 2
20	6. (カップリング) 各アミノ基保護アミノ酸 (5 当量) / NMP 溶液 0.9 ml、DIC (5 当量) / NMP 溶液 0.3 ml	30 × 1
	7. (洗浄) DMF 1.2 ml	1 × 4

実施例 6

Asp-Phe-Met-Ile-Gln-Gly-Gly-Asp-Phe

25 (配列番号: 2) の合成

実施例 5 と同様にして、Fmoc-Phe-Alko Resin 100 mg を用いて、Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gln-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Asp(OtB

5 u) -OHを順次カップリングさせ、その後脱保護を行った。得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め0.1% TFA水で平衡化させた逆相系充填剤COSMOSIL 5C18-ARカラム(25φ×250mm)に注入し、カラムを0.1% TFA水で洗浄後、アセトニトリル濃度を260分で31%まで増加させ、流速7ml/min.で溶出した。溶出液をA220nmでモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、Asp-Phe-Met-Ile-Gln-Gly-Gly-Asp-Phe 3.6mgを得た。

10 得られたAsp-Phe-Met-Ile-Gln-Gly-Gly-Asp-Pheは、逆相系充填剤YMC-PACK ODS-AMカラム(4.6φ×250mm)を用いた、0%から60%までの0.1% TFAを含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間25.8分を示し、そのアミノ酸分析値(ただし、Metは検出せず)および質量分析値は理論値と一致した。

アミノ酸分析

15 加水分解: 1%フェノール/6N塩酸水溶液、110℃、24時間
分析法: ニンヒドリン法

*基準アミノ酸 () 内理論値

Asx : 2.02 (2)

Glx : 1.04 (1)

20 Gly : 2.04 (2)

*Ile : 1.00 (1)

Phe : 1.97 (2)

質量分析 (FAB)

[M+H]⁺ : 1029

25 実施例7

腫瘍抗原ペプチドの同定

先の実施例5および6で合成した2種のペプチドについて、実施例4と同様の実験をペプチド濃度を0.001~1000μg/mlの範囲で行った結果、これらのペプチドが腫瘍抗原ペプチドとして機能していることが明らかになった。その結果を図

1 及び図 2 に示す。図中横軸はペプチド濃度 (pg/ml) を、縦軸は KG-CTL が産生した IFN- γ 量 (pg/ml) を示す。「84-92」及び「91-99」を、HLA-A2402 cDNA の組換えプラスミドをトランスフェクトした COS-7 細胞にパルスした場合に、濃度依存的に KG-CTL の反応性が増加した。また、HLA-A2601 cDNA の組換えプラスミドをトランスフェクトした COS-7 細胞にパルスした場合よりも、前記 HLA-A2402 cDNA の組換えプラスミドをトランスフェクトした場合のほうが、KG-CTL は高い反応性を示した。以上の結果より、「84-92」及び「91-99」の 2 つのペプチドは、HLA-A24 拘束性の腫瘍抗原ペプチドとして機能していることが示された。

実施例 8

10 L y s - T y r - H i s - A r g - V a l - I l e - L y s - A s p - P h e (配列番号 : 39) の合成

実施例 7 により、「84-92」及び「91-99」が腫瘍抗原ペプチドとして機能していることが明らかとなったため、HLA-A24 の結合モチーフ上置換可能なアミノ酸の範囲内から、第 2 位のフェニルアラニンをチロシンに置換した誘導体、「84-92・2F-Y」(配列番号 : 39) および、「91-99・2F-Y」(配列番号 : 40) を、それぞれ合成した。

L y s - T y r - H i s - A r g - V a l - I l e - L y s - A s p - P h e
(配列番号 : 39) については、実施例 5 と同様にして、Fmoc-Phe-Alko Resin 100mg を用いて、Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH を順次カップリングさせ、その後脱保護を行った。得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め 0.1% TFA 水で平衡化させた逆相系充填剤 COSMOS IL 5 C18-AR カラム (25 ϕ \times 250 mm) に注入し、カラムを 0.1% TFA 水で洗浄後、アセトニトリル濃度を 200 分で 25% まで増加させ、流速 7 ml/min. で溶出した。溶出液を A220nm でモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、L y s - T y r - H i s - A r g - V a l - I l e - L y s - A s p - P h e 44.9mg を得た。

得られた $\text{Lys-Tyr-His-Arg-Val-Ile-Lys-Asp-Phe}$ は、逆相系充填剤 YMC-PACK ODS-AM カラム ($4.6 \phi \times 250 \text{ mm}$) を用いた、0% から 60% までの 0.1% TFA を含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間 17.7 分を示し、その

5 アミノ酸分析値および質量分析値は理論値と一致した。

アミノ酸分析

加水分解：1% フェノール / 6 N 塩酸水溶液、110°C、24 時間

分析法：ニンヒドリン法

* 基準アミノ酸 () 内理論値

10 $\text{Asx} : 1.06$ (1)

* $\text{Val} : 1.00$ (1)

$\text{Ile} : 0.85$ (1)

$\text{Tyr} : 0.89$ (1)

$\text{Phe} : 0.95$ (1)

15 $\text{Lys} : 1.85$ (2)

$\text{His} : 0.98$ (1)

$\text{Arg} : 0.91$ (1)

質量分析 (FAB)

$[\text{M}+\text{H}]^+ : 1206$

20 実施例 9

$\text{Asp-Tyr-Met-Ile-Gln-Gly-Gly-Asp-Phe}$

(配列番号：40) の合成

実施例 5 と同様にして、 $\text{Fmoc-Phe-Alko Resin}$ 100 mg を用いて、 Fmoc-Asp(OtBu)-OH , Fmoc-Gly-OH ,
 25 Fmoc-Gly-OH , Fmoc-Gln-OH , Fmoc-Ile-OH ,
 Fmoc-Met-OH , Fmoc-Tyr(tBu)-OH , Fmoc-Asp(OtBu)-OH を順次カップリングさせ、その後脱保護を行った。得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め 0.1% TFA 水で平衡化させた逆相系充填剤 COSMOSIL 5C18-AR カラム ($25 \phi \times 250 \text{ mm}$) に注入し、

カラムを0.1% TFA水で洗浄後、アセトニトリル濃度を200分で27%まで増加させ、流速7 ml/min. で溶出した。溶出液をA220 nmでモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、Asp-Tyr-Met-Ile-Gln-Gly-Gly-Asp-Phe 12.8 mgを得た。

- 5 得られたAsp-Tyr-Met-Ile-Gln-Gly-Gly-Asp-Pheは、逆相系充填剤YMC-PACK ODS-AMカラム(4.6 ϕ × 250 mm)を用いた、0%から60%までの0.1% TFAを含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間24.7分を示し、そのアミノ酸分析値(ただし、Metは検出せず)および質量分析値は理論値と一致した。
- 10

アミノ酸分析

加水分解: 1% フェノール/6 N塩酸水溶液、110℃、24時間

分析法: ニンヒドリン法

* 基準アミノ酸 () 内理論値

- 15 Asx : 2.04 (2)
 Glx : 1.02 (1)
 Gly : 2.06 (2)
 * Ile : 1.00 (1)
 Tyr : 0.82 (1)
 Phe : 0.98 (1)
- 20

質量分析 (FAB)

[M+H]⁺ : 1045

実施例 10

腫瘍抗原ペプチド及びその誘導体による末梢血リンパ球からのCTL誘導

- 25 実施例5で合成した「84-92」(配列番号: 1)及び実施例8で合成した「84-92-2F-Y」(配列番号: 39)のペプチドを用いて、末梢血リンパ球から抗原特異的なCTLが誘導できるか検討した。

HLA-AローカスがA24のヘテロである白血病患者の末梢血からフィコール法によりリンパ球を分離した。24穴プレートに2 × 10⁶細胞/穴となるようにリン

パ球を加え、リンパ球培養液で培養した。培養液に前記腫瘍抗原ペプチドを $10 \mu\text{M}$ になるように加え、末梢血リンパ球を刺激した。1週間後、X線照射 (50 Gy) した約 2×10^5 個の末梢血リンパ球とともに前記腫瘍抗原ペプチドを $10 \mu\text{M}$ になるように加えて、2回目の刺激を行った。さらに1週間後、3回目の刺激を同様に繰り返した。3回目の刺激から1週間後、培養したリンパ球を回収した。本発明の腫瘍抗原タンパク質 (サイクロフィリンB) を発現しておりHLA-A2402陽性のEBウイルスでトランスフォームしたB細胞株であるBEC-2、及び本発明の腫瘍抗原タンパク質を発現しているがHLA-A2402陰性のEBウイルスでトランスフォームしたB細胞株であるBan-B1をそれぞれ標的細胞 (1×10^4 個) として、前記のリンパ球 (8×10^4 個) が反応して産生する培養上清中の $\text{IFN-}\gamma$ 量をELISAで測定した。結果を表6に示す。

表6

上清中の $\text{IFN-}\gamma$ (pg/ml)		
抗原ペプチド	BEC-2	Ban-B1
「84-92」	383	38
「84-92・2F-Y」	489	63
なし	245	74

さらに、前記「84-92」 (配列番号: 1) 及び「84-92・2F-Y」 (配列番号: 39) と共に、実施例6で合成した「91-99」 (配列番号: 2) 及び実施例9で合成した「91-99・2F-Y」 (配列番号: 40) についても前記と同様の実験を行った。結果を表7に示す。

表 7

上清中の I F N- γ (p g / m l)		
抗原ペプチド	BEC-2	Ban-B1
「84-92」	1896	160
5 「84-92・2F-Y」	710	46
「91-99」	>2000	40
「91-99・2F-Y」	650	100

「84-92」、「84-92・2F-Y」、「91-99」及び「91-99・2F-Y」のペプチドで刺激した末梢血リンパ球は、HLA-A24陽性のBEC-2に反応したが、HLA-A24陰性のBan-B1には反応しなかったことから、HLA-A24拘束性の抗原ペプチド特異的なCTLが誘導されていることが示された。また、「84-92・2F-Y」及び「91-99・2F-Y」のペプチドで刺激した末梢血リンパ球は、「84-92」及び「91-99」のペプチドで刺激した末梢血リンパ球と同様にBEC-2に反応したことから、ペプチドを置換した誘導体は、オリジナルのペプチドと同様のCTL誘導能を有することが示された。

15 なお本実験で用いたBEC-2の代わりに、HLA-A2402のcDNA (Genbank Accession No. M64740) 発現プラスミドをCOS-7細胞 (ATCC No. CRL1651) や VA-13細胞 (理化学研究所細胞銀行) に導入して前記ペプチドをパルスした細胞を用い、また本実験で用いたBan-B1の代わりに、前記HLA-A2402のcDNA発現プラスミドを前記COS-7細胞や VA-13細胞に導入して前記ペプチドをパルスしない細胞を用いることによっても、同様の実験を行うことが可能である

(J. Exp. Med., 187:277, 1998)。

実施例 1 1

サイクロフィリン由来ペプチドの合成

25 前記実施例 1 ～ 1 0 によりサイクロフィリンBが腫瘍抗原タンパク質であることが明らかとなったため、次に、サイクロフィリンBのホモログとして知られているサイクロフィリンA、サイクロフィリンC及びサイクロフィリンDについても同様の活性が存するか否かを検討した。

サイクロフィリンA、サイクロフィリンC及びサイクロフィリンDについてもそのアミノ酸配列が明らかにされているため (Biochemistry, 3:p8218, 1994)、

この文献をもとに、HLA-A24の結合モチーフを有するサイクロフィリンAのアミノ酸配列の第59位から第67位の配列よりなるペプチド（配列番号：41、以下、該ペプチドをCyp-A「59-67」と称することもある）、サイクロフィリンCのアミノ酸配列の第89位から第97位の配列よりなるペプチド（配列番号：42、以下、該ペ

5 チドをCyp-C「89-97」と称することもある）及びサイクロフィリンDのアミノ酸配列の第94位から第102位の配列よりなるペプチド（配列番号：43、以下、該ペプチドをCyp-D「94-102」と称することもある）を選択し、Fmoc法にてペプチドを合成した。一例として以下に Cyp-A「59-67」（配列番号：41）の合成方法および結果を記載する。

10 樹脂はFmoc-Phe-AlkoResin (0.67 mmol/g, 100-200 mesh) を用いた。この樹脂50 mgを用いて、後記スケジュール1（表8）に従って合成を開始し、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Gln-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Gly-OHを順次カップリングさせた。カップリングの後ス

15 ケジュール1（表8）の工程3まで行い、その結果、ペプチド樹脂が得られた。

このペプチド樹脂にReagent K（5%フェノール、5%チオアニソール、5% H_2O 、2.5%エタンジチオール/TFA溶液）1 mlを加え、室温で2.5時間反応させた。氷冷下反応液にジエチルエーテル10 mlを加え10分間攪拌し、濾過しジエチルエーテル10 mlで洗浄した。濾上物に酢酸水10 mlを加えて30分間攪拌後、樹脂を濾別し、酢酸水4 mlで洗浄した。濾洗液を凍結乾燥後、得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め0.1% TFA水で平衡化させた逆相系充填剤YMC-PACK ODS-AS-363-5（30 Φ \times 250 mm）に注入し、カラムを0.1% TFA水で洗浄後、アセトニトリル濃度を0%から15%まで60分、15%から30%まで240分かけて増加させ、流速7 ml/minで溶出した。溶出液を220 nmでモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、Gly-Phe-Met-Cys-Gln-Gly-Gly-Asp

20

25

得られたGly-Phe-Met-Cys-Gln-Gly-Gly-Asp

—P h e を、逆相系充填剤 YMC—PAK ODS—AM AM303 (4.6Φ × 250mm) を用い分析した結果、18%から48%までの0.1% TFA を含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法において、保持時間18.8分を示し、そのアミノ酸分析値 (C y s は検出できず) および質量分析値は、理論値と一致した。

アミノ酸分析

加水分解：1%フェノール／6N塩酸水溶液、110℃、10時間

分析法：ニンヒドリン法

*基準アミノ酸 () 内理論値

10 A s x : 0.99 (1)
 G l x : 1.06 (1)
 G l y : 2.96 (3)
 M e t : 0.99 (1)
 * P h e : 2.00 (2)

15

質量分析 (FAB)

[M+H]⁺ : 961

表 8

スケジュール 1

20	工程	時間 (分) × 処理回数
	1. (洗浄) DMF 1.2 ml	1 × 2
	2. (脱保護) 50%ピペリジン／DMF	12 × 1
	3. (洗浄) DMF 1.2 ml	1 × 7
	4. (カップリング) 各アミノ基保護アミノ酸 (5当量) ／NMP溶液0.9 ml、D I C (5当量) ／NMP	
25	溶液0.3 ml	30 × 1
	5. (洗浄) DMF 1.2 ml	1 × 2
	6. (カップリング) 各アミノ基保護アミノ酸 (5当量) ／NMP溶液0.9 ml、D I C (5当量) ／NMP	

溶液 0. 3 m l

3 0 × 1

7. (洗浄) DMF 1. 2 m l

1 × 4

実施例 1 2

サイクロフィリン由来ペプチドによる末梢血リンパ球からのCTL誘導

- 5 実施例 1 1 で合成した3種のペプチドを用いて、末梢血リンパ球から抗原特異的なCTLが誘導できるか検討した。HLA-AローカスがA24のホモである健常人の末梢血からフィコール法によりリンパ球を分離した。実施例 1 0 と同様の方法によりリンパ球を前記ペプチドで3回刺激した。3回目の刺激から1週間後、リンパ球を回収し、D. D. Kharkevitchら著、Int. J. Cancer, 58:317(1994)に記載の方法
- 10 に従って、⁵¹Crで標識されたHLA-A24陽性のT細胞リンパ腫由来細胞株KOPT-K1及びHLA-A24陰性のT細胞白血病細胞株RPMI8402を標的細胞として細胞傷害活性を測定した。結果を表 9 に示す。

表 9

15 刺激ペプチド	標的細胞に対する傷害活性(%)	
	KOPT-K1	RPMI8402
Cyp-A 「59-67」	2 7	0
Cyp-C 「89-97」	2 0	0
Cyp-D 「94-102」	2 2	0

- 20 Cyp-A 「59-67」、Cyp-C 「89-97」及びCyp-D 「94-102」のペプチドで刺激したリンパ球は、HLA-A24陽性のKOPT-K1に反応したが、HLA-A24陰性のRPMI8402には反応しなかったことから、HLA-A24拘束性の抗原ペプチド特異的なCTLが誘導されていることが示された。以上の結果から、サイクロフィリンB以外のサイクロフィリンも腫瘍抗原として機能することが明らかとなった。

- 25 なお、本実験で用いたKOPT-K1およびRPMI8402の代わりに、実施例 1 0 の最後に記載した組換え細胞を用いた手法によっても、同様の実験を行うことが可能である。

実施例 1 3

サイクロフィリンタンパク質による末梢血リンパ球からのCTL誘導

文献 (J. Immunol., 158:1796, 1997, Cancer Res., 59:1184, 1999等) に記載の

方法を参考にして、本発明のサイクロフィリン又はその部分ポリペプチド、あるいは本発明のサイクロフィリン由来腫瘍抗原ペプチドなどをパルスすることにより、HLA抗原とサイクロフィリン由来腫瘍抗原ペプチドとの複合体の提示された抗原提示細胞を作製することができる。また、所望の抗原提示細胞が作製されたか否かは、当該抗原提示細胞により末梢血リンパ球から抗原特異的CTLが誘導されるか否かを指標として調べることができる。以下、健常人末梢血を用いた一例を述べるが、腫瘍患者の末梢血を用いても同様の手法により抗原提示細胞が調製できることは言うまでもない。

まず、HLA-A24陽性の健常人末梢血からフィコール法によりリンパ球を分離する。リンパ球を培養フラスコで37℃、3時間静置した後、非付着細胞を除く。付着細胞をGM-CSF(2000U/ml)、IL-4(2000U/ml)存在下で7日間培養し、抗原提示能が高い細胞として知られている樹状細胞を誘導する。回収した樹状細胞は、10 μ g/mlの本発明の腫瘍抗原ペプチド、または100 μ g/mlの本発明の腫瘍抗原タンパク質(サイクロフィリン)又はその部分ポリペプチドと共に、37℃、2時間培養してパルスした後、X線照射(5000rad)する。前記の健常人の末梢血リンパ球からバイオマグネティックセパレーションビーズ(Dynal社)を用いて調製したCD8⁺のT細胞と、前記ペプチドまたはタンパク質をパルスした樹状細胞とを24穴プレートで混合培養し、抗原刺激を行う。刺激の翌日にIL-2(100U/ml)を添加する。約1週ごとに、同様に前記のペプチドあるいはタンパク質をパルスした樹状細胞を用いてT細胞の刺激をする(2~4回)。最後の刺激から1週間後、培養したT細胞を回収する。本発明の腫瘍抗原タンパク質を発現しておりHLA-A24陽性のEBウイルスでトランスフォームしたB細胞株であるBEC-2、及び本発明の腫瘍抗原タンパク質を発現しているがHLA-A24陰性のEBウイルスでトランスフォームしたB細胞株であるBan-B1をそれぞれ標的細胞として、前記のT細胞の反応性を実施例10と同様に培養上清中のIFN- γ 量をELISAで測定するか、または実施例12と同様に⁵¹Crで標識した標的細胞に対する傷害活性を測定する。抗原特異的なCTLが誘導されている場合は、BEC-2に対してのみ反応が認められる。以上の実験を行うことにより、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたは腫瘍抗原タンパク質等をパルスした抗原提示細胞(樹状細胞)が抗原特異的なCTL誘導活性を有するか否かを測定

することができる。

なお本実験で用いたBEC-2の代わりに、HLA-A2402のcDNA (Genbank Accession No. M64740) 発現プラスミドをCOS-7細胞 (ATCC No. CRL1651) や VA-13細胞 (理化学研究所細胞銀行) に導入して本発明の腫瘍抗原ペプチドまたは腫瘍抗原タンパク質をパルスした細胞を用い、また本実験で用いたBan-B1の代わりに、前記 HLA-A2402のcDNA発現プラスミドを前記COS-7細胞や VA-13細胞に導入して前記ペプチド等をパルスしない細胞を用いることによっても、同様の実験を行うことが可能である (J. Exp. Med., 187:277, 1998)。

10 配列表フリーテキスト

配列番号：37に記載のアミノ酸配列の第2番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、チロシン、メチオニンまたはトリプトファンであり、第9番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンである。

15 配列番号：38に記載のアミノ酸配列の第2番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、チロシン、メチオニンまたはトリプトファンであり、第9番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンである。

産業上の利用の可能性

20 本発明により、サイクロフィリン由来の腫瘍抗原ペプチドおよび機能的に同等の特性を有するその誘導体、さらにはこれらの腫瘍抗原ペプチドおよびその誘導体やサイクロフィリンポリペプチドまたはその遺伝子を、in vivoまたはin vitroで利用した腫瘍の治療剤、予防剤または診断薬などを提供することができる。

請 求 の 範 囲

1. サイクロフィリン由来の部分ペプチドであって、かつHLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体。

2. サイクロフィリンB由来の部分ペプチドであって、かつHLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体。

3. HLA抗原がHLA-A24またはHLA-A2である請求項1または2記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体。

4. 配列番号：1～配列番号：36、または配列番号：41～配列番号：43のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、請求項3記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体。

5. 配列番号：1または配列番号：2に記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、請求項4記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体。

6. 配列番号：1～配列番号：36のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位および／またはC末端のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、請求項4記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体。

7. 配列番号：1または配列番号：2に記載のアミノ酸配列の第2位および／またはC末端のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、請求項6記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体。

8. 配列番号：1～配列番号：11のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンまたはトリプトファンに置換され、および／またはC末端のアミノ酸残基がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイ

シン、トリプトファンまたはメチオニンに置換されたアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、請求項6記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体。

9. 配列番号：12～配列番号：36のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位がロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンに置換され、
5 および／またはC末端のアミノ酸残基がバリンまたはロイシンに置換されたアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、請求項6記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体。

10. 配列番号：37または配列番号：38に記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、請求項8記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体。

10 11. 配列番号：39または配列番号：40に記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、請求項10記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体。

12. 請求項1～11いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドおよびその誘導体から選択される少なくとも1種を有効成分として含有してなる、腫瘍の治療剤または
15 予防剤。

13. サイクロフィリン、またはHLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチド部分を含むサイクロフィリンの部分ポリペプチド、あるいはこれらサイクロフィリンまたはその部分ポリペプチドをコードする遺伝子を有効成分として含有してなる、腫瘍の治療剤または
20 予防剤。

14. サイクロフィリンB、またはHLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチド部分を含むサイクロフィリンBの部分ポリペプチド、あるいはこれらサイクロフィリンBまたはその部分ポリペプチドをコードする遺伝子を有効成分として含有してなる、腫瘍の治療剤または
25 予防剤。

15. 請求項1～11いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体に特異的に結合する抗体。

16. 腫瘍患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞の表面に、HLA抗原と請求項1～11いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を提示させてなる抗原提示細胞。

17. サイクロフィリン、またはHLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチド部分を含むサイクロフィリンの部分ポリペプチド

ド、あるいはこれらサイクロフィリンまたはその部分ポリペプチドをコードする遺伝子を、腫瘍患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞に取り込ませて作製される、HLA抗原と当該サイクロフィリン由来の腫瘍抗原ペプチドとの複合体の提示された抗原提示細胞。

- 5 18. サイクロフィリンB、またはHLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチド部分を含むサイクロフィリンBの部分ポリペプチド、あるいはこれらサイクロフィリンBまたはその部分ポリペプチドをコードする遺伝子を、腫瘍患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞に取り込ませて作製される、HLA抗原と当該サイクロフィリンB由来の腫瘍抗原ペプチドとの複合体の提示された抗原提示細胞。
- 10

19. 請求項16～18いずれか記載の抗原提示細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤。

20. HLA抗原と請求項1～11いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を特異的に認識する細胞傷害性T細胞。

- 15 21. 請求項16～18いずれか記載の抗原提示細胞に提示されたHLA抗原と腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を特異的に認識する細胞傷害性T細胞。

22. 請求項20または21記載の細胞傷害性T細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤。

- 20 23. 受託番号がFERM BP-6725である、細胞傷害性T細胞KG-CTL。

24. 請求項23記載のKG-CTLを用いることを特徴とする、腫瘍抗原タンパク質または腫瘍抗原ペプチドの同定方法。

- 25 25. 請求項1～11いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体を有効成分として含有する、腫瘍の診断薬。

図 1

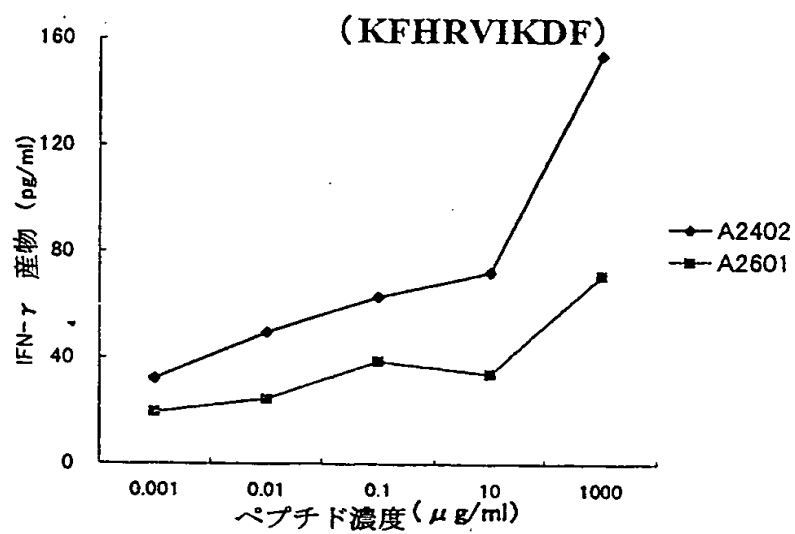
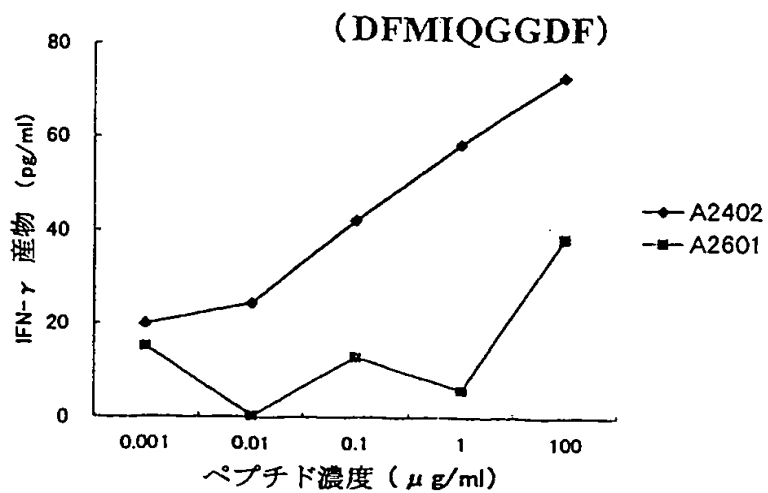


図 2



1/13

SEQUENCE LISTING

<110> ITOH, Kyogo; Sumitomo Pharmaceuticals Company, Limited

<120> Tumor Antigen Peptides Derived From Cyclophilin B

<130> 661366

5 <140>

<141>

<150> Japan: 98-178449

<151> 25. 06. 98

<160> 43

10

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 1

Lys Phe His Arg Val Ile Lys Asp Phe

1 5

<210> 2

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Asp Phe Met Ile Gln Gly Gly Asp Phe

25 1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

2/13

<213> Homo sapiens

<400> 3

Gly Phe Gly Tyr Lys Asn Ser Lys Phe

1

5

5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 4

Gly Tyr Lys Asn Ser Lys Phe His Arg Val Ile

1

5

10

<210> 5

15

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asn Phe Lys Leu Lys His Tyr Gly Pro Gly Trp

20

1

5

10

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

25

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ile Tyr Gly Glu Arg Phe Pro Asp Glu Asn Phe

1

5

10

3/13

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 7

Arg Phe Pro Asp Glu Asn Phe Lys Leu

1

5

<210> 8

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

His Tyr Gly Pro Gly Trp Val Ser Met

15 1

5

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 9

Phe Phe Ile Thr Thr Val Lys Thr Ala Trp

1

5

10

25 <210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

4/13

Ala Trp Leu Asp Gly Lys His Val Val Phe

1 5 10

<210> 11

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Val Phe Gly Lys Val Leu Glu Gly Met

10 1 5

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 12

Lys Val Leu Leu Ala Ala Ala Leu

1 5

20 <210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

25 Leu Leu Ala Ala Ala Leu Ile Ala Gly Ser Val

1 5 10

<210> 14

<211> 10



5/13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Ala Leu Ile Ala Gly Ser Val Phe Phe Leu

5 1 5 10

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 15

Ala Leu Ile Ala Gly Ser Val Phe Phe Leu Leu

1 5 10

15 <210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

20 Leu Ile Ala Gly Ser Val Phe Phe Leu

1 5

<210> 17

<211> 10

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Leu Ile Ala Gly Ser Val Phe Phe Leu Leu

1 5 10

6/13

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 18

Leu Ile Ala Gly Ser Val Phe Phe Leu Leu Leu

1

5

10

10 <210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

15 Lys Val Thr Val Lys Val Tyr Phe Asp Leu

1

5

10

<210> 20

<211> 8

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Thr Val Lys Val Tyr Phe Asp Leu

1

5

25

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

7/13

<400> 21

Asp Leu Arg Ile Gly Asp Glu Asp Val

1 5

5 <210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

10 Asp Val Gly Arg Val Ile Phe Gly Leu

1 5

<210> 23

<211> 11

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Arg Val Ile Phe Gly Leu Phe Gly Lys Thr Val

1 5 10

20

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 24

Gly Leu Phe Gly Lys Thr Val Pro Lys Thr Val

1 5 10

<210> 25

8/13

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

5 Thr Val Pro Lys Thr Val Asp Asn Phe Val

1 5 10

<210> 26

<211> 8

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Thr Val Asp Asn Phe Val Ala Leu

1 5

15

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 27

Lys Leu Lys His Tyr Gly Pro Gly Trp Val

1 5 10

<210> 28

25 <211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Ser Gln Phe Phe Ile Thr Thr Val



9/13

1 5

<210> 29

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Phe Ile Thr Thr Val Lys Thr Ala Trp Leu

1 5 10

10

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 30

Trp Leu Asp Gly Lys His Val Val

1 5

<210> 31

20 <211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

His Val Val Phe Gly Lys Val Leu

25 1 5

<210> 32

<211> 8

<212> PRT



10/13

<213> Homo sapiens

<400> 32

Lys Val Leu Glu Gly Met Glu Val

1 5

5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 33

Lys Val Leu Glu Gly Met Glu Val Val

1 5

<210> 34

15

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Val Leu Glu Gly Met Glu Val Val

20

1 5

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

25

<213> Homo sapiens

<400> 35

Val Leu Glu Gly Met Glu Val Val Arg Lys Val

1 5 10

11/13

<210> 36

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 36

Gly Met Glu Val Val Arg Lys Val

1 5

<210> 37

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

15 <222> 2

<223> Xaa is Phe, Tyr, Met or Trp.

<220>

<221> VARIANT

<222> 9

20 <223> Xaa is Phe, Leu, Ile, Trp or Met.

<400> 37

Lys Xaa His Arg Val Ile Lys Asp Xaa

1 5

25 <210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>



•

•

•

•

•

•

12/13

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa is Phe, Tyr, Met or Trp.

<220>

5

<221> VARIANT

<222> 9

<223> Xaa is Phe, Leu, Ile, Trp or Met.

<400> 38

Asp Xaa Met Ile Gln Gly Gly Asp Xaa

10

1

5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

15

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<400> 39

Lys Tyr His Arg Val Ile Lys Asp Phe

20

1

5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

25

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<400> 40

Asp Tyr Met Ile Gln Gly Gly Asp Phe

13/13

1 5

<210> 41

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Gly Phe Met Cys Gln Gly Gly Asp Phe

1 5

10

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 42

Asp Phe Met Ile Gln Gly Gly Asp Ile

1 5

<210> 43

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Thr Phe His Arg Val Ile Pro Ser Phe

25 1 5



1/1

PCT

原本（出願用） - 印刷日時 1999年06月23日 (23. 06. 1999) 水曜日 13時06分50秒

0-1	寄託された微生物又はその他の生物材料に関する表示 (PCT規則13の2) (様式 - PCT/R0/134 (EASY)) は、右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.84 (updated 01.06.1999)
0-2	国際出願番号	
0-3	出願人又は代理人の書類記号	661366
1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
1-1	記載頁	25
1-2	行	25-28
1-3	寄託の表示	
1-3-1	寄託機関の名称	通商産業省・工業技術院生命工学技術研究所 (NIBH)
1-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒305-0046 茨城県つくば市東1丁目1-3
1-3-3	寄託の日付	1999年05月20日 (20. 05. 1999)
1-3-4	受託番号	NIBH FERM BP-6725
1-4	追加の表示	寄託微生物は申請者指定専門家にのみ分譲されることを要求する
1-5	この表示を行うための指定国	EP: (AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE) (AT CH&LI DE DK ES FI GB LU PT SE)
1-6	追加事項の表示の届け出 右記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。	なし (NONE)

受理官庁記入欄

0-4	この用紙は国際出願とともに受理した (はい/いいえ)	24.06.99
0-4-1	権限のある職員	清井 貴幸

国際事務局記入欄

0-5	この用紙が国際事務局に受理された日	12 JUL 1999
0-5-1	権限のある職員	経 済



4

5

6

7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP99/03360

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C07K14/47, 7/06, 7/08, 16/18, C12N5/00, A61K35/12, 38/08, 39/00, 48/00, G01N33/53, 33/574

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C07K14/47, 7/06, 7/08, 16/18, C12N5/00, A61K35/12, 38/08, 39/00, 48/00, G01N33/53, 33/574

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN), REGISTRY (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	E. ROYDON PRICE et al., "Human cyclophilin B: A second cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl isomerase with a signal sequence", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 88(5), p.1903-1907 (1991, Particularly refer to Fig. 1	1-25
Y	Hans-Georg Rammensee et al., "MHC ligands and peptides motifs: first listing", Immunogenetics, Vol. 41, p.178-228 (1995), Particularly refer to pages 193, 195	1-12
Y	JP, 8-500106, A (Cytel Corp.), 9 January, 1996 (09. 01. 96), Refer to reference as a whole & WO, 94/3205, A1 & EP, 656788, A1	1-12
Y	JP, 9-151200, A (Ajinomoto Co., Inc.), 10 June, 1997 (10. 06. 97), Refer to reference as a whole & EP, 770624, A2 & KR, 97015602, A & US, 5837248, A	1-25

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 September, 1999 (14. 09. 99)

Date of mailing of the international search report
28 September, 1999 (28. 09. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C07K14/47, 7/06, 7/08, 16/18, C12N5/00, A61K35/12, 38/08, 39/00, 48/00, G01N33/53, 33/574

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C07K14/47, 7/06, 7/08, 16/18, C12N5/00, A61K35/12, 38/08, 39/00, 48/00, G01N33/53, 33/574

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), REGISTRY (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	E. ROYDON PRICE et al., "Human cyclophilin B: A second cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl isomerase with a signal sequence", Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 88 (5), p. 1903-1907 (1991), 特に FIG. 1 参照	1-25
Y	Hans-Georg Rammensee et al., "MHC ligands and peptides motifs: first listing", Immunogenetics, Vol. 41, p. 178-228 (1995), 特に p. 193, 195 参照	1-12
Y	JP, 8-500106, A (サイテル コーポレーション), 9. 1 月. 1996 (09. 01. 96), 文献全体参照, & WO, 94/3205, A1 & EP, 656788, A1	1-12
Y	JP, 9-151200, A (味の素株式会社), 10. 6 月. 1997 (10. 06. 97), 文献全体参照, & EP, 770624, A2 & KR, 97015602, A & US, 5837248, A	1-25

☐ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 09. 99

国際調査報告の発送日

28.09.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂崎 恵美子 印

4 N

9 4 5 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



1
2
3

4
5
6